



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

**REPRODUCCIÓN A PARTIR DE ESPORAS DE
GIGARTINA SKOTTSBERGII Y *SARCOTHALIA CRISPATA*
(RHODOPHYTA) DE LA PATAGONIA ARGENTINA
Y APLICACIÓN FARMACÉUTICA
DE SUS CARRAGENANOS**

Melanie Hebe Hughes

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

**REPRODUCCIÓN A PARTIR DE ESPORAS DE
GIGARTINA SKOTTSBERGII Y *SARCOTHALIA CRISPATA*
(RHODOPHYTA) DE LA PATAGONIA ARGENTINA
Y APLICACIÓN FARMACÉUTICA
DE SUS CARRAGENANOS**

Melanie Hebe Hughes

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, y del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, CONICET-UNS) durante el período comprendido entre el 15 de octubre de 2013 y el 23 de noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Patricia I. Leonardi y la co-dirección de la Dra. Karina M. Michetti.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la
calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora y co-directora, las Dras. Patricia Leonardi y Karina Michetti, por haberme guiado desde mis inicios en la investigación y principalmente en la realización de esta tesis, apoyándome y dando libertad para llevar a cabo las tareas.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la beca para llevar a cabo el doctorado.
- Al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, por brindarme las instalaciones y los medios necesarios para la realización de esta Tesis.
- A la Dra. Cristina Matulewicz, del Departamento de Química Orgánica y Centro de Investigación de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), CONICET-UBA, por su calidez humana y por haberme recibido en tres ocasiones en su laboratorio brindándome los medios y conocimiento necesarios para llevar a cabo un capítulo de esta tesis.
- A la Dra. Cecilia Rodríguez, del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la UBA, por haber estado al lado mío en todo momento durante el desarrollo de la parte química de esta Tesis, siempre dispuesta a ayudarme en lo que sea necesario. También quisiera agradecer a Yasmín, por los momentos compartidos, su buena predisposición y paciencia durante mis estadías en la UBA.
- Al Dr. Héctor Prado, del Departamento de Tecnología Farmacéutica II de la UBA, por su fundamental colaboración para realizar las experiencias de liberación controlada de fármacos.
- Al personal técnico del CERZOS, Jorge y Ricky, por su buena predisposición en todo momento y por permitir que siempre esté disponible el material para los ensayos en tiempo y forma.
- A mis compañeros del Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas, Ceci D, Ceci P, Delfina, Lucas y Paola, por crear un ambiente de trabajo ameno, con alegría y humor cada día. También a Naty y Guada, quienes ya no forman parte del laboratorio, pero con las que compartí los inicios de mi doctorado.

- A mis amigos de la carrera, Clara, Julia, Carla y Diego, por estar siempre, cerca o lejos, y por compartir los sentimientos que se generan en cada etapa de realización de un doctorado.
- A mi familia (abuelos, tíos y primos), por estar e intentar entenderme en la particular carrera que elegí seguir.
- A Maxi, por acompañarme y apoyarme en absolutamente todo, soportando todos mis estados de ánimo.
- Y por último lo más importante, a mis papás. A mi mamá, que estuvo siempre para lo que necesité, y también me ayudó en cada aspecto que pudo durante mi carrera y doctorado. A mi papá, que desde el principio me acompañó a bucear en cada viaje de muestreo, verano o invierno, siempre con interés y optimismo, y que sin su ayuda no podría haber llevado a cabo este trabajo.

RESUMEN

Las macroalgas han sido utilizadas como alimento desde tiempos ancestrales y actualmente también son usadas con diversas aplicaciones en distintas industrias. Las algas rojas Gigartinales constituyen un recurso económico de gran valor debido a su contenido de carragenanos. Éstos son polisacáridos sulfatados presentes en la pared celular, ampliamente utilizados como gelificantes, estabilizantes y espesantes en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. En Argentina, *Gigartina skottsbergii* ha sido explotada para la obtención de carragenanos desde la década del 70 y *Sarcothalia crispata* ha sido señalada como materia prima potencial con este fin. Estas especies pertenecen a la familia Gigartinaceae, cuyos miembros se caracterizan por tener gametofitos que producen carragenanos gelificantes del tipo Kappa/lota-, y tetrasporofitos productores de carragenanos espesantes o viscosantes del tipo Lambda-. En base a estos antecedentes, el objetivo general de esta tesis fue el estudio de las macroalgas carragenófitas *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* del Mar Argentino, incluyendo aspectos morfológicos y reproductivos relevantes con el fin de obtener información que sirva de base para el desarrollo de futuros esporocultivos comerciales y para el manejo de praderas naturales. Este estudio también estuvo orientado a la búsqueda de aplicaciones novedosas de los carragenanos extraídos de estas especies.

Para llevar a cabo los objetivos mencionados, se realizaron ensayos a escala de laboratorio para determinar la disponibilidad de carpósporas y tetrásporas de *G. skottsbergii* y *S. crispata* coleccionadas en Cabo Raso (Chubut, Argentina), así como la optimización de las condiciones para su liberación a partir de frondes fértiles. Se iniciaron esporocultivos *in vitro* para estudiar la germinación de las esporas y evaluar sustratos potenciales para el asentamiento y desarrollo de las plántulas. Además, se realizó la extracción y caracterización de los carragenanos de las generaciones gametofíticas de ambas especies y se llevó a cabo la formación de complejos interpolielectrolito (IPECs) con los mismos y el copolímero Eudragit E. Estos IPECs fueron evaluados para la liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos utilizando ibuprofeno como fármaco modelo.

La disponibilidad estacional de esporas de *G. skottsbergii* resultó limitada, obteniéndose cantidades considerables de carpósporas y tetrásporas únicamente en los meses de invierno y primavera. La aplicación de diferentes métodos de inducción de la liberación de esporas (deseccación y shock osmótico) no resultó en una mayor obtención de esporas, registrándose valores similares a los obtenidos con la liberación espontánea.

Por otro lado, la incubación de las frondes cistocárpicas y tetráspóricas bajo distintas temperaturas no mostró un efecto en la liberación de carpósporas y tetrásporas respectivamente, mientras que el aumento de horas de luz tuvo un efecto positivo en la liberación de tetrásporas, aunque esto no se observó en la liberación de carpósporas. Los esporocultivos iniciados en laboratorio, tanto con carpósporas como con tetrásporas de esta especie, mostraron bajas tasas de supervivencia de plántulas en todos los sustratos evaluados (vidrio, conchillas y piedras).

En *S. crispata*, la aplicación de métodos de inducción (deseccación, shock osmótico, baja temperatura) tampoco tuvo efecto en la liberación de carpósporas o tetrásporas. Por ello, para ambas especies, la liberación espontánea de esporas sería un método adecuado para la obtención tanto de carpósporas como de tetrásporas, por ser menos laboriosa y costosa que los demás métodos evaluados. En *S. crispata*, la liberación de esporas por área de fronde resultó mayor en talos tetráspóricos que en talos cistocárpicos, aspecto relevante a la hora de iniciar cultivos selectivos para la obtención de materia prima específica para la extracción de un tipo determinado de carragenano. Las plántulas tetráspóricas y gametofíticas desarrollaron sobre los cuatro sustratos evaluados (vidrio, sogas, conchillas y piedras), registrándose las mayores densidades, al igual que un adecuado crecimiento, sobre conchillas y piedras a los tres meses de cultivo. Estos sustratos, al ser obtenidos del ambiente natural, no implicarían un riesgo para su inserción en el ecosistema marino. Las sogas no presentaron altas densidades ni buen crecimiento de plántulas.

La caracterización de los carragenanos de las generaciones gametofíticas de ambas especies dio como resultado un producto mayormente Kappa, aunque con cantidades menores pero considerables de estructuras Iota y Nu. Los IPECs formados entre estos carragenanos y el copolímero Eudragit E se utilizaron para la elaboración de comprimidos conteniendo ibuprofeno. Los IPECs mostraron características particulares en su composición química y a nivel ultraestructural en cada una de las especies, lo cual se vio reflejado en una liberación más lenta de ibuprofeno en el IPEC formado por el carragenano de *S. crispata*.

El trabajo realizado aporta información valiosa para el manejo de praderas de *Gigartina skottsbergii*. De acuerdo a los resultados obtenidos, la posibilidad de implementar esporocultivos piloto de *Sarcothalia crispata* se presenta con mayor factibilidad que en el caso de *G. skottsbergii*. La liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos constituye una aplicación novedosa de los carragenanos de estas dos especies nativas de la Patagonia argentina.

ABSTRACT

Seaweeds have been used as food since ancestral times and, nowadays, they are also employed with diverse applications in different industries. The red algae belonging to the order Gigartinales are a valuable economic resource because of their high carrageenan content. These are cell wall sulphated polysaccharides, widely used as gelling, stabilizing, and viscosity binding agents in the food industry, cosmetics and pharmaceutical formulations. In Argentina, *Gigartina skottsbergii* has been exploited for carrageenan production since 1970, and *Sarcothalia crispata* has been pointed out as potential raw material for this purpose. These species belong to the Gigartinaceae family, whose members are characterized for having gametophytes that produce Kappa/Iota-carrageenan and tetrasporophytes that produce Lambda-carrageenan. Based on this background information, the main objective of this thesis was to study the carrageenophytes *Gigartina skottsbergii* and *Sarcothalia crispata* from the Argentinian Sea, including relevant morphological and reproductive aspects, with the aim of obtaining basic information for the implementation of future spore cultures and for the management of natural beds. This study was also oriented to the pursuit of novel applications for the carrageenans extracted from these species.

To carry out the mentioned objectives, laboratory experiments were performed to determine the availability of carpospores and tetraspores from *G. skottsbergii* and *S. crispata* collected near Cabo Raso (Chubut, Argentina), as well as the optimization of the conditions for their release from fertile fronds. *In vitro* spore cultures were initiated to study spore germination and to evaluate potential substrates for the settlement and development of germlings. In addition, the extraction and characterization of carrageenans from the gametophytic generations of both species was carried out, as well as the preparation of interpolyelectrolyte complexes (IPECs) among each carrageenan and the copolymer Eudragit E. These IPECs were tested for the release of active pharmaceutical ingredients using ibuprofen as a model drug.

The availability of *G. skottsbergii* spores was limited throughout the year, obtaining considerable amounts of both carpospores and tetraspores only during winter and spring. The application of different induction methods for spore release (desiccation and osmotic shock) did not result in a higher amount of spores, obtaining similar values than with spontaneous discharge. Incubation of fertile cystocarpic and tetrasporic fronds under different temperatures did not have an effect on the release of carpospores and tetraspores, respectively, while the increase in daylight hours had a positive effect on the release of

tetraspores, not showing the same effect on that of carpospores. Laboratory cultures of *G. skottsbergii* carpospores and tetraspores showed low survival of sporelings on all the evaluated substrates (glass, shells and gravel).

In *Sarcothalia crispata*, the application of induction methods (desiccation, osmotic shock, low temperature) had also no effect on the release of carpospores or tetraspores. For this reason, spontaneous discharge of spores would be an adequate method for obtaining both carpospores and tetraspores of both species. This method would be less expensive and laborious than the other evaluated ones. In *S. crispata*, spore release per frond area was higher for tetrasporic than for cystocarpic fronds, which is a relevant aspect when initiating selective cultures for obtaining specific raw material for the extraction of certain type of carrageenan. Carposporelings and tetrasporelings developed on the four evaluated substrates (glass, ropes, shells and gravel), registering the highest densities, as well as an adequate growth, on shells and gravel on the third month of culture. As these substrates were obtained from the natural environment, they would not imply a risk for the marine ecosystem when being transplanted to the sea. Ropes did not have high densities or good growth of germlings.

Characterization of carrageenans of the gametophytic generations of both species indicated a Kappa-carrageenan as a major product. However, minor but considerable amounts of Iota and Nu structures were also present. The IPECs prepared with each carrageenan and the copolymer Eudragit E were employed for the preparation of tablets containing ibuprofen. The IPECs showed particular characteristics regarding their chemical composition and ultrastructure on each species, which was supported by a slower ibuprofen release profile for the IPEC prepared with the carrageenan from *S. crispata*.

This study presents valuable information for the management of *Gigartina skottsbergii* natural beds. According to the obtained results, the possibility of implementing pilot spore cultures of *Sarcothalia crispata* is presented with more feasibility than the case of *G. skottsbergii*. The controlled release of active pharmaceutical ingredients constitutes a novel application for the carrageenans of these native species from the Argentinian Patagonia.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis se desarrolla en cinco capítulos.

En el **capítulo 1**, se realiza una introducción general al tema tratado en la tesis. Se hace un breve resumen de los usos de las macroalgas marinas, en especial de las algas rojas productoras de hidrocoloides. Se analiza su explotación a partir de praderas naturales y/o cultivos. Se realiza una reseña de la situación en Argentina en cuanto a la utilización de macroalgas, desarrollo de cultivos y trabajos realizados en el tema, con énfasis en las algas productoras de carragenanos.

En el **capítulo 2**, se describen los materiales y metodologías generales de la tesis. Se desarrolla el proceso de recolección del material algal y su transporte al laboratorio, así como también los protocolos y recetas utilizadas en el laboratorio. En los respectivos capítulos, se presentan los materiales y métodos específicos de cada uno.

En el **capítulo 3**, se estudia la disponibilidad, liberación y germinación de esporas de *Gigartina skottsbergii*. Se realiza una breve introducción al tema de estudio, se desarrollan los materiales y métodos específicos del capítulo, y se exponen los resultados obtenidos comparándolos con bibliografía previa. En primer lugar, se evalúa la madurez de las estructuras reproductivas y la disponibilidad de esporas estacionalmente. Posteriormente se analizan diversos factores que pueden afectar a la liberación de esporas. Por último, se presenta una experiencia de esporocultivo *in vitro* sobre diferentes sustratos.

En el **capítulo 4**, se evalúa la obtención de esporas de *Sarcothalia crispata* y el cultivo *in vitro* de las mismas. Se realiza una introducción a la temática, se describen los materiales y métodos específicos, y se presentan y discuten los resultados. En primer lugar, se evalúan diferentes métodos para la inducción de la liberación de esporas. Posteriormente, se presenta una experiencia de cultivo de las mismas sobre distintos sustratos, analizando su supervivencia, germinación y crecimiento.

En el **capítulo 5**, se estudian los carragenanos de las generaciones gametofíticas de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata*. Se realiza la introducción al tema, se explican los materiales y métodos específicos, detallando las técnicas utilizadas, se presentan los resultados y se los compara con bibliografía existente. En primer lugar, se realiza la extracción y caracterización de los carragenanos de ambas especies. Posteriormente se emplean estos carragenanos para la formación de complejos interpolielectrolito. Por último,

se evalúa el comportamiento de los complejos interpolielectrolito formados en la liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos.

Finalmente se presenta una **síntesis y conclusiones generales** del trabajo, se detalla la **bibliografía** citada, y se exponen las **publicaciones** derivadas de esta tesis.

ÍNDICE

PREFACIO.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	viii
CAPÍTULO 1. Introducción.....	1
1. LAS MACROALGAS Y SUS USOS.....	2
2. LOS HIDROCOLOIDES EN ALGAS ROJAS.....	3
2.1. AGAR	3
2.3. CARRAGENANOS	4
3. LAS ALGAS CARRAGENÓFITAS.....	5
3.1. CARACTERÍSTICAS Y CICLO DE VIDA	5
3.2. ESPECIES UTILIZADAS COMO MATERIA PRIMA	7
3.3. <i>GIGARTINA SKOTTSBERGII</i> Y <i>SARCOTHALIA CRISPATA</i>	7
4. CULTIVOS DE MACROALGAS.....	8
4.1. ESTRATEGIAS DE CULTIVO	8
4.1.1. Cultivo vegetativo	8
4.1.2. Esporocultivo	8
4.2. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS.....	9
4.3. OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA PARA LA EXTRACCIÓN DE CARRAGENANOS	10
5. SITUACIÓN EN ARGENTINA	11
5.1. RECURSOS ALGALES Y SU UTILIZACIÓN	11
5.2. ANTECEDENTES EN CULTIVOS DE MACROALGAS	12
5.3. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS EN ESPECIES CARRAGENÓFITAS	12
CAPÍTULO 2. Materiales y métodos.....	14
1. SITIO DE MUESTREO	15
2. TEST DE RESORCINOL	18
2.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO RESORCINOL-ACETAL	18
2.2. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DEL CICLO DE VIDA.....	18

3.	MEDIO DE CULTIVO.....	19
3.1.	RECOLECCIÓN DE AGUA DE MAR	19
3.2.	SOLUCIÓN DE ENRIQUECIMIENTO PROVASOLI	20
3.3.	DIÓXIDO DE GERMANIO	21
3.3.1.	Preparación de la solución de GeO ₂	21
3.4.	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	21
4.	ENSAYOS DE LABORATORIO.....	21
4.1.	MATERIAL DE VIDRIO	22
5.	OTROS MÉTODOS.....	22
5.1.	RECuento DE ESPORAS	22
5.2.	MEDICIONES	23

CAPÍTULO 3. *Gigartina skottsbergii*: disponibilidad estacional, liberación y gemrinación de esporas.....24

1.	INTRODUCCIÓN	25
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1.	MADUREZ DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS Y DISPONIBILIDAD ESTACIONAL DE ESPORAS	26
2.1.1.	Densidad de cistocarpos y soros tetrasporangiales	27
2.1.2.	Tamaño de cistocarpos y soros tetrasporangiales	27
2.1.3.	Liberación de carpósporas y tetrásporas	27
2.1.4.	Tamaño de carpósporas y tetrásporas.....	28
2.2.	LIBERACIÓN DE ESPORAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES	28
2.2.1.	Métodos de inducción.....	28
2.2.2.	Temperatura	29
2.2.3.	Fotoperiodo	29
2.3.	GERMINACIÓN	29
2.4.	EXPERIENCIA DE ESPOROCULTIVO SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS ..	30
2.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
3.	RESULTADOS.....	31
3.1.	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	31
3.2.	MADUREZ DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS Y LIBERACIÓN ESTACIONAL DE ESPORAS	32
3.2.1.	Densidad de estructuras reproductivas	34
3.2.2.	Tamaño de estructuras reproductivas	38
3.2.3.	Liberación de carpósporas y tetrásporas	40

3.3.	LIBERACIÓN DE ESPORAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES	45
3.3.1.	Métodos de inducción.....	45
3.3.2.	Temperatura	47
3.3.3.	Fotoperiodo	49
3.4.	PROCESO DE GERMINACIÓN DE ESPORAS.....	52
3.5.	EXPERIENCIAS DE ESPOROCULTIVO SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS	54
4.	DISCUSIÓN	56

CAPÍTULO 4. *Sarcothalia crispata*: liberación de esporas y germinación sobre distintos sustratos

62

1.	INTRODUCCIÓN	63
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
2.1.	DISPONIBILIDAD DE ESPORAS	64
2.1.1.	Densidad y tamaño de estructuras reproductivas.....	64
2.1.2.	Métodos de inducción de la liberación de esporas	65
2.2.	GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE ESPORAS	65
2.2.1.	Germinación de carpósporas y tetrásporas	65
2.2.2.	Cultivo <i>in vitro</i> sobre sustratos artificiales y naturales	66
2.2.2.1.	Densidad y supervivencia de plántulas	67
2.2.2.2.	Crecimiento de plántulas.....	67
2.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
3.	RESULTADOS.....	68
3.1.	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	68
3.2.	DISPONIBILIDAD DE ESPORAS	69
3.2.1.	Densidad y tamaño de estructuras reproductivas.....	69
3.2.2.	Métodos de inducción de la liberación de esporas	71
3.3.	GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO	75
3.3.1.	Germinación de carpósporas y tetrásporas	75
3.3.2.	Cultivo <i>in vitro</i> sobre sustratos artificiales y naturales	78
3.3.2.1.	Densidad y supervivencia de plántulas	78
3.3.2.2.	Crecimiento de plántulas.....	81
4.	DISCUSIÓN	86

CAPÍTULO 5. Carragenanos de <i>Gigartina skottsbergii</i> y <i>Sarcothalia crispata</i>: análisis estructural y formación de complejos interpolielectrolito para la liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos	90
1. INTRODUCCIÓN	91
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
2.1. EXTRACCIÓN	94
2.2. CARACTERIZACIÓN	94
2.2.1. Hidratos de carbono totales.....	95
2.2.2. Proteínas	95
2.2.3. Sulfato	96
2.2.4. Monosacáridos constituyentes	97
2.2.4.1. Hidrólisis reductiva.....	97
2.2.4.2. Determinación de la configuración absoluta de las unidades de 3,6- anhidrogalactosa	98
2.2.5. Tratamiento alcalino	98
2.2.6. Análisis estructural por metilación	99
2.2.7. Cromatografía gas-líquido (CGL)	100
2.2.7.1. Análisis de los alditoles peracetilados	100
2.2.7.2. Análisis de los alditoles permetilados	100
2.2.7.3. Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles.....	100
2.2.8. Métodos espectroscópicos	100
2.2.8.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	100
2.2.8.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	101
2.3. COMPLEJOS INTERPOLIELECTROLITO (IPECs)	101
2.3.1. Formación de IPECs.....	101
2.3.2. Liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos	102
2.3.2.1. Preparación de comprimidos	102
2.3.2.2. Hinchamiento y erosión	102
2.3.2.3. Liberación de ibuprofeno	103
2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	104
3. RESULTADOS.....	104
3.1. RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN.....	104
3.2. COMPLEJOS INTERPOLIELECTROLITO (IPECs)	110
3.2.1. Formación de IPECs	110
3.2.2. Liberación de ibuprofeno	110

3.2.2.1. Hinchamiento y erosión de los comprimidos	110
3.2.2.2. Liberación de ibuprofeno	110
3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	112
4. DISCUSIÓN	114
SÍNTESIS Y CONCLUSIONES	116
BIBLIOGRAFÍA.....	119
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	133
ANEXO	

CAPÍTULO 1

Introducción

1. LAS MACROALGAS Y SUS USOS

Las algas forman un grupo polifilético, es decir, que no comparten un origen común, por lo que no es sencillo definirlas. Son organismos autótrofos, que tienen clorofila *a* como pigmento fotosintético principal, y carecen de cubierta de células estériles alrededor de las estructuras reproductivas (Lee 2008). Pueden ser desde organismos unicelulares a individuos de estructura compleja, que llegan a medir más de 60 m de longitud, aunque no presentan el nivel de organización de las plantas vasculares (Barsanti y Gualtieri 2006). Se las puede encontrar en diversos ambientes, aunque en su mayoría son acuícolas, siendo los productores primarios de la cadena trófica (Lee 2008). Según Guiry (2012) hay alrededor de 70.000 especies de algas. Las macroalgas pertenecen a las Divisiones Rhodophyta (algas rojas), Ochrophyta (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes). En particular, esta tesis está enfocada en el estudio de dos especies de macroalgas rojas de importancia económica que crecen en la costa patagónica argentina.

Las macroalgas marinas han sido utilizadas por el hombre desde tiempos ancestrales (Dillehay et al. 2008), inicialmente con fines domésticos, como el consumo humano, y posteriormente, también con fines industriales (Delaney et al. 2016). En general, las algas empleadas como alimento son costosas y su valor agregado es relativamente bajo, mientras que las que se emplean industrialmente tienen bajo costo, pero su valor agregado suele ser elevado (Boraso de Zaixso et al. 2015).

Actualmente los mayores consumidores de macroalgas para alimentación son Japón, China y Corea, aunque este uso también se ha extendido a otros países como Estados Unidos y algunos de Sudamérica (McHugh 2003). Las principales macroalgas utilizadas con este fin son *Saccharina japonica* (= *Laminaria japonica*) (kombu), *Undaria pinnatifida* (wakame), *Durvillaea antarctica* (cochayuyo), *Hizikia fusiformis* (hiziki) y *Pyropia* spp. (nori), *Ulva rigida* y *U. lactuca* (lechuga de mar) (Mc Hugh 1991; Rioux et al. 2017).

Las macroalgas también han sido empleadas tradicionalmente para otros usos además del consumo humano. La utilización de algas con fines industriales, inicialmente estuvo enfocada en la explotación de arribazones para fertilizantes y posteriormente ganó importancia la obtención de hidrocoloides a partir de praderas naturales y en algunos casos de cultivos (Buschmann et al. 2017). Actualmente su explotación también se encuentra enfocada en la obtención de productos de mayor valor agregado, con fines farmacéuticos, nutraceuticos y cosmetológicos, sumados a la extracción de polisacáridos (Hafting et al. 2015; Delaney et al. 2016). Incluso, en algunos casos, esta explotación tiende a orientarse

bajo el concepto de biorrefinerías, es decir, la producción secuencial de productos valiosos a partir de la biomasa algal, dejando los demás sin adulterar para ser usados en alimentación o para fertilizantes y, a su vez, minimizando los desechos generados por el proceso y el impacto del mismo en el medio ambiente (Buschmann et al. 2017).

La producción de hidrocoloides (o ficocoloides) ha ido en aumento en las últimas décadas (Zemke-White y Ohno 1999; Bixler y Porse 2011), y varias especies de macroalgas son utilizadas como materia prima con este fin. Los hidrocoloides son polisacáridos sulfatados de gran importancia, principalmente en la industria alimentaria, como espesantes de soluciones acuosas, para formar geles, films solubles en agua, y para estabilizar algunos productos (McHugh 2003; Carvalho y Pereira 2015). Las algas pardas producen alginatos (así como también fucoidano y laminarano) y las rojas agar y carragenanos (Carvalho y Pereira 2015). Si bien, como se mencionó anteriormente, la producción de otros compuestos bioactivos provenientes de macroalgas está ganando importancia para la industria, como por ejemplo suplementos para la nutrición humana, de animales y de plantas; los hidrocoloides siguen siendo los extractos algales de mayor importancia comercial (Bixler y Porse 2011).

2. LOS HIDROCOLOIDES EN ALGAS ROJAS

La pared celular de las algas rojas representa el 30-50% del peso seco del alga (Craigie 1990). Está compuesta por una matriz fibrilar formada principalmente por celulosa, xilanos o mananos y una matriz amorfa formada por polisacáridos, generalmente sulfatados.

La matriz amorfa en algunas especies de la Clase Florideophyceae puede llegar a constituir más del 65% de la pared y está compuesta por galactanos sulfatados, solubles en agua, de gran importancia en las industrias alimentaria y farmacéutica (Matulewicz et al. 1989; Barsanti y Gualtieri 2006). Estos galactanos incluyen al agar (formado por agarosa y agarpectina) y los carragenanos (Lee 2008), que poseen propiedades coloidales únicas, siendo las algas rojas la única fuente de obtención de los mismos (Graham y Wilcox 2000).

2.1. AGAR

El agar (Fig. 1.1) es un polisacárido compuesto por unidades alternantes de β -D-galactopiranosas y α -L-galactopiranosas, pudiendo estar esta última en parte o totalmente en forma del derivado 3,6- anhidro (Usov 2011). Este galactano sulfatado es usado como

agente gelificante en alimentos y como medio de soporte inerte en cultivos microbianos (Pereira y Ribeiro Claro 2015).

Se extrae principalmente de especies de *Gelidium* y *Gracilaria*, y en menor cantidad de *Pterocladia* y *Gelidiella* (McHugh 1991). *Gelidium* es el alga marina preferida para la producción de agar de calidad bacteriológica y farmacéutica, mientras que *Gracilaria* es la principal fuente de materia prima para agar de calidad alimentaria (Bixler y Porse 2011).

2.3. CARRAGENANOS

Los carragenanos están formados, al igual que el agar, por unidades alternantes de β y α -galactopiranosas, con la diferencia que la subunidad α tiene la configuración D en los carragenanos (Usov 2011) (Fig. 1.1). Estos polisacáridos sulfatados tienen gran importancia económica como gelificantes, estabilizantes y viscosantes en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Usov 2011). Además, se están estudiando otras aplicaciones de estos hidratos de carbono, como son la liberación controlada de fármacos (Li et al. 2014) y su actividad antiviral (Damonte et al. 2004).

Estos galactanos se extraen de algas rojas del orden Gigartinales, como por ejemplo *Kappaphycus alvarezii* ("cottonii"), *Eucheuma denticulatum* ("spinosum"), *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* y *Chondrus crispus* (Boraso de Zaixso et al. 2015).

Comercialmente existen diferentes tipos de carragenanos (Kappa-, Iota-, Lambda-), cada uno con propiedades y usos particulares (Pereira y Ribeiro-Claro 2015) (Fig. 1.1).

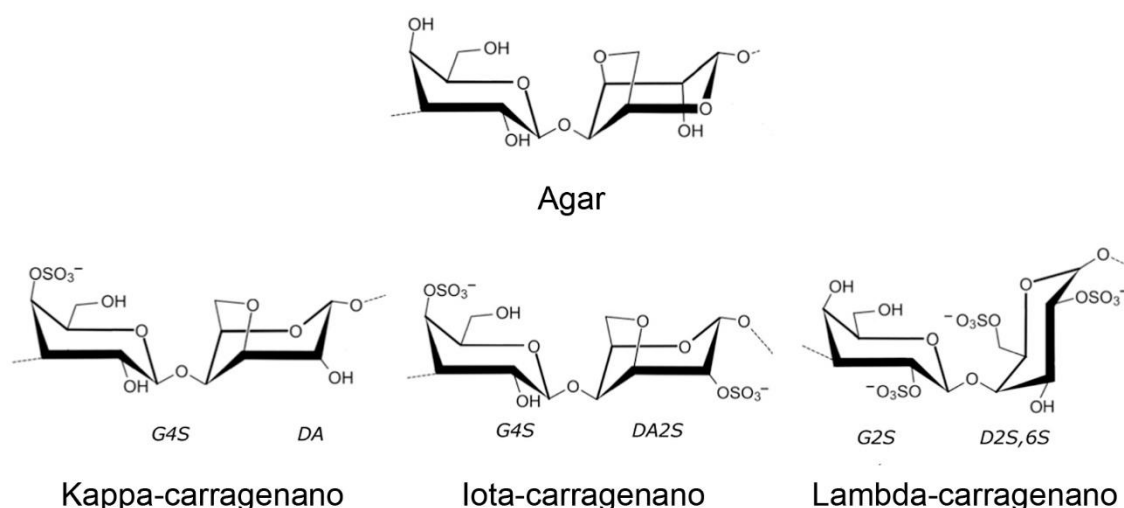


Fig. 1.1. Estructura química idealizada de los polisacáridos de algas rojas: agar y carragenanos Kappa-, Iota- y Lambda-. (Adaptado de Pereira y Ribeiro Claro 2015)

3. LAS ALGAS CARRAGENÓFITAS

3.1. CARACTERÍSTICAS Y CICLO DE VIDA

Las algas productoras de carragenanos pertenecen a la Clase Florideophyceae, Orden Gigartinales, Familias Gigartinaceae y Phyllophoraceae (Usov 2011). El ciclo de vida característico de este grupo es triplobionte haplodiplonte (Fig. 1.2), el cual consiste en tres generaciones (gametofito, tetrasporofito y carposporofito), dos de las cuales son de vida libre. En este ciclo de vida, los **gametofitos** haploides, monoicos o dioicos, producen gametas masculinas (espermacios) en espermatangios y gametas femeninas (oogametas) en carpogonios. Los espermacios, que carecen de flagelos, fecundan la oogameta, desarrollando sobre el gametofito femenino un **carposporofito** diploide rodeado de una pared (pericarpio), proveniente del gametofito; formando una estructura llamada cistocarpo. Por esta razón, el gametofito femenino con cistocarpos suele llamarse talo cistocárpico. Este carposporofito produce carpósporas diploides, que al germinar dan lugar a un **tetrasporofito** diploide. Éste produce tetrásporas por meiosis, las cuales al liberarse y germinar originan nuevamente los gametofitos (Scagel et al. 1991; Lee 2008).

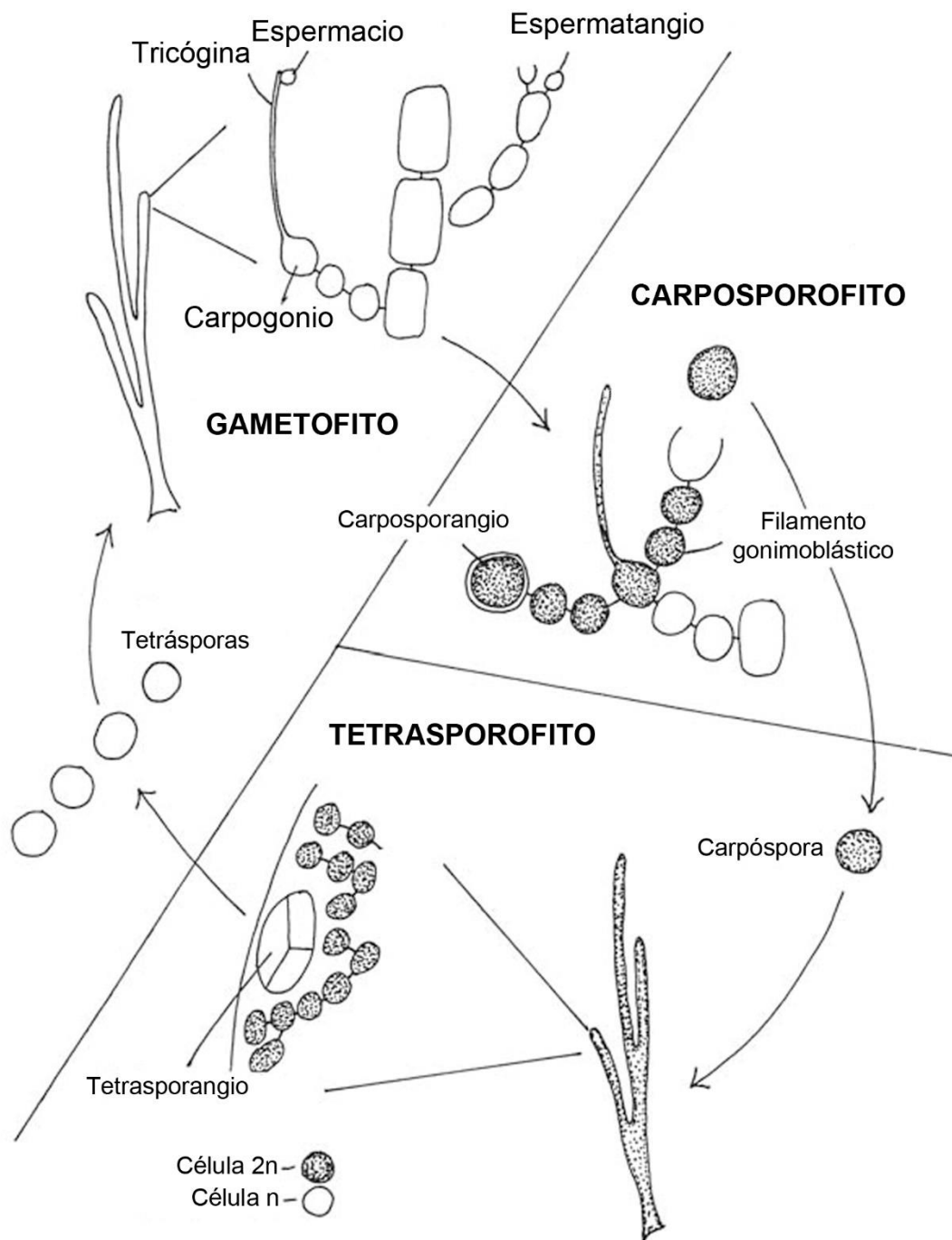


Fig. 1.2. Ciclo de vida simplificado de las algas rojas de la Clase Florideophyceae. (Adaptado de Lee 2008)

3.2. ESPECIES UTILIZADAS COMO MATERIA PRIMA

Actualmente, los carragenanos provienen principalmente de las especies de aguas cálidas *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex PC Silva y *Eucheuma denticulatum* (N.L. Burman) Collins & Harvey, procedentes de Filipinas e Indonesia (Bixler y Porse 2011; FAO 2016). Las especies de aguas frías *Gigartina skottsbergii* Setchell & N. L. Gardner, *Sarcothalia crispata* (Bory) Leister y *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq, procedentes principalmente de Chile, son de gran importancia ya que de ellas se extrae un tipo de carragenano que no producen las especies de aguas cálidas (McHugh 2003; Bixler y Porse 2011). *Chondrus crispus* Stackhouse es cosechada en Canadá, Estados Unidos y Francia y, a pesar de ser la fuente original de carragenanos, en los últimos años su uso ha sido limitado (Mc Hugh 2003). Otras especies de importancia como productoras de carragenanos son *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux, *Chondracanthus chamissoi* (C.Agardh) Kützinger y *Gigartina canaliculata* Harvey (Mc Hugh 1991, 2003; Hayashi et al. 2014).

3.3. GIGARTINA SKOTTSBERGII Y SARCOTHALIA CRISPATA

Las especies estudiadas en esta tesis, *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata*, pertenecen a la familia Gigartinaceae. Una particularidad de las familias Gigartinaceae y Phyllophoraceae es que los gametofitos producen carragenanos del tipo Kappa/lota-, mientras que los tetrasporofitos producen carragenanos del tipo Lambda- (Craigie 1990; Usov 2011).

Ambas especies son endémicas del sur de Sudamérica y, en el caso de *G. skottsbergii*, también se encuentra en la Antártida e islas subantárticas (Quartino et al. 2005; Hommersand et al. 2009). Estas especies son cosechadas a partir de praderas naturales principalmente en Chile, estando entre las principales algas rojas explotadas en este país (Bixler y Porse 2011; Hayashi et al. 2014). Como se mencionó anteriormente, el carragenano extraído a partir de gametofitos de *G. skottsbergii* y *S. crispata* es del tipo Kappa/lota- y, de tetrasporofitos, del tipo Lambda-, a diferencia de los extraídos de *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma denticulatum* que son casi puramente Kappa- e lota-, respectivamente, independientemente de la fase del ciclo de vida (Bixler et al. 2001). La importancia de esto radica en que el carragenano Kappa/lota- forma geles más débiles, con distintas propiedades que el carragenano Kappa- extraído de *K. alvarezii*, o lota-, producido por *E. denticulatum* (Bixler et al. 2001). Además, procesando gametofitos y tetrasporofitos por separado, se lograrían obtener carragenanos con propiedades

diferentes a partir de la misma especie, pudiendo así mejorar la calidad del producto industrial.

4. CULTIVOS DE MACROALGAS

4.1. ESTRATEGIAS DE CULTIVO

Existen dos tipos de estrategias de cultivos de macroalgas: algunas especies pueden propagarse vegetativamente, mientras que otras solo pueden reproducirse a través de esporas, involucrando una alternancia de generaciones. Los diferentes taxa requieren distintos métodos para su cultivo: *Eucheuma*, *Kappaphycus*, *Chondrus* y *Gracilaria* se propagan vegetativamente en un proceso de un solo paso, mientras que los cultivos de *Pyropia*, *Saccharina* y *Undaria* se realizan a través de esporas en un proceso de dos o más pasos (Sahoo y Yarish 2005).

4.1.1. Cultivo vegetativo

El cultivo vegetativo consiste en tomar fragmentos pequeños de frondes y colocarlos en un ambiente que soporte su desarrollo, utilizando como sustrato cuerdas, redes suspendidas entre dos postes o balsas flotantes, e incluso insertando fragmentos del alga directamente en el fondo marino mediante distintas herramientas (Sahoo y Yarish 2005). Una vez que estos fragmentos alcanzan un tamaño adecuado, se cosechan removiendo el talo entero o dejando una pequeña porción para que vuelva a crecer (Mc Hugh 2003).

Este tipo de estrategia de cultivo tiene como ventaja que requiere poco tiempo para obtener biomasa cosechable. Sin embargo, presenta la desventaja del envejecimiento de las poblaciones, ya que no hay intercambio genético.

4.1.2. Esporocultivo

El cultivo a través de esporas implica una alternancia de generaciones y es generalmente empleado en especies de algas rojas, debido al tipo de ciclo de vida que poseen (Mc Hugh 2003). Esta estrategia de cultivo requiere una etapa de criadero en estanques antes de que los sustratos inoculados sean trasplantados al mar (Santelices 1999).

Este tipo de cultivo requiere cuidados adicionales en comparación con el cultivo vegetativo y por ello es más costoso. Sin embargo, presenta la ventaja de que, al haber

reproducción sexual se obtienen plántulas con variabilidad genética, reduciendo así el envejecimiento o desgaste de las poblaciones.

4.2. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS

Mundialmente la acuicultura de organismos de interés económico está creciendo sostenidamente como alternativa al uso de recursos pesqueros cada vez más escasos (Buschmann et al. 2013). De hecho, en 2013, el volumen de producción global de peces y algas cultivadas sobrepasó el de pesquerías de captura (FAO 2013).

Con respecto al cultivo comercial de algas, éste ha crecido alrededor del 8% anual en la última década y, actualmente, se practica en alrededor de 50 países (FAO 2016). Unas 100 especies de macroalgas han sido probadas a campo para su cultivo, aunque solo aproximadamente una docena están siendo cultivadas en la actualidad de manera comercial (Sahoo y Yarish 2005). Indonesia y China son los mayores productores de algas mediante cultivos (Buschmann et al. 2017). El cultivo de las carragenófitas *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma* spp. en Indonesia es el mayor contribuyente al crecimiento de la producción de algas a nivel mundial. En 10 años, Indonesia incrementó más de 10 veces la producción de macroalgas marinas cultivadas, llegando en 2014 a 10 millones de toneladas, lo que corresponde a un 36.9% de la producción de macroalgas cultivadas a nivel mundial (FAO 2016). Por su parte, China produce principalmente *Saccharina japonica* y *Undaria pinnatifida* para alimento, así como también los géneros de algas rojas *Pyropia* y *Gracilaria* (FAO 2016). Conjuntamente, estos seis géneros representan el 98% de la producción de algas marinas por cultivo (Pereira y Yarish 2008) (Tabla 1.1). En América, solo Chile figura en las estadísticas de cultivo de algas, debido al cultivo de *Gracilaria* (Buschmann et al. 2017).

Tabla 1.1. Producción de algas marinas mediante cultivos. Los valores representan miles de toneladas anuales. (Tomado de FAO 2016)

	2005	2010	2013	2014
<i>Kappaphycus alvarezii</i> y <i>Eucheuma</i> spp.	2.44	5.63	10.39	10.99
<i>Saccharina japonica</i>	4.37	5.15	5.94	7.66
<i>Gracilaria</i> spp.	936	1.7	3.46	3.75
<i>Undaria pinnatifida</i>	2.44	1.54	2.08	2.36
<i>Porphyra</i> spp.	1.29	1.64	1.86	1.81
<i>Sargassum fusiforme</i>	86	78	152	175
<i>Spirulina</i> spp.	48	97	82	86
Otras plantas acuáticas	1.89	3.17	2.9	482
TOTAL	13.50	18.99	26.87	27.31

4.3. OBTENCIÓN DE MATERIA PRIMA PARA LA EXTRACCIÓN DE CARRAGENANOS

Estudios detallados de los ciclos de vida condujeron al desarrollo de cultivos industriales que hoy en día suministran una alta proporción de la materia prima para la extracción de hidrocoloides (Mc Hugh 2003). Como se mencionó anteriormente, solo seis géneros de macroalgas constituyen el 98 % de la biomasa de algas cultivada y tres de ellos se cultivan como materia prima para la producción de hidrocoloides: *Eucheuma* y *Kappaphycus* se utilizan para la extracción de carragenanos y *Gracilaria* para la extracción de agar.

De las carragenófitas mencionadas, *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma* spp. son las únicas cultivadas comercialmente (Mc Hugh 2003; Bixler y Porse 2011). Éstas son cultivadas por propagación vegetativa principalmente en Filipinas e Indonesia y, en menor medida, en Malasia, Cambodia, Vietnam, China, Tanzania, Madagascar, Belice y Brasil (Kim et al. 2017).

Las demás especies de algas que se utilizan como biomasa para la extracción de carragenanos se obtienen de praderas naturales. *Chondrus crispus* en Canadá, Estados

Unidos de América y Francia; *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* y *Mazzaella laminarioides* en Chile, *Hypnea musciformis* en Brasil y *Gigartina canaliculata* en México (Mc Hugh 2003).

5. SITUACIÓN EN ARGENTINA

5.1. RECURSOS ALGALES Y SU UTILIZACIÓN

En Argentina, existen numerosas especies de macroalgas de interés económico. Entre las más relevantes se pueden mencionar a *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia vadosa*, *Gracilaria gracilis*, *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia* spp., *Pyropia columbina*, y la especie invasora *Undaria pinnatifida* (Rebours et al. 2014; Boraso de Zaixso et al. 2015).

El interés por la explotación comercial de estos recursos comenzó en la década del 50, por la Empresa Soriano S.A., mediante la producción de alginato de sodio a partir del alga parda *Macrocystis pyrifera*, recolectada en Chubut (Piriz y Casas 1996a). Posteriormente se sumó la recolección de *Gracilaria gracilis* y *Gigartina skottsbergii* para la producción de agar y carragenanos, respectivamente (Piriz y Casas 1996a).

En el año 1974 comenzó la fabricación de un producto llamado “carragel” que consistía en talos de *G. skottsbergii* blanqueados y molidos luego de aplicarle un tratamiento alcalino. Años después, para completar esta materia prima se incorporó al proceso de producción *Kappaphycus* proveniente de Filipinas, llegando a abastecer aproximadamente el 50% del consumo interno (Soriano 1980). En 1980 la empresa Soriano S.A. inicia la obtención de carragenanos a partir de un proceso de extracción, cuyas cantidades dependían de la demanda existente (Boraso de Zaixso et al. 2015). Los carragenanos y harina de carragenófitas han abastecido el mercado local y en ocasiones fueron exportados a Uruguay y Bolivia (Hayashi et al. 2014). Según la información suministrada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), en el período 1992-2003 se exportaron un promedio de cuatro toneladas de carragenanos y se importaron alrededor de 298 toneladas; siendo éstos los últimos datos registrados por el INDEC.

Por su parte, *Sarcothalia crispata* ha sido señalada como materia prima potencial para la producción de carragenanos, aunque solo ocasionalmente ha sido cosechada y procesada junto a *G. skottsbergii* (Boraso y Quartino 1993; Boraso de Zaixso et al. 1998).

En la última década se ha visto una notable disminución en la explotación de algas en el país, lo que puede deberse a la dinámica de los mercados internacionales y a la disminución de la materia prima, entre otros factores (Boraso de Zaixso et al. 2015).

5.2. ANTECEDENTES EN CULTIVOS DE MACROALGAS

En Argentina han habido escasos intentos de cultivo experimental de macroalgas y ninguno ha incluido especies carragenófitas.

En Golfo Nuevo se llevaron a cabo cultivos vegetativos del alga agarófita *Gracilis gracilis* usando distintos métodos, obteniéndose los mejores resultados con el plantado directo sobre el fondo marino utilizando horquillas, mientras que el sistema de cuerdas sufrió grandes pérdidas de material (Casas y Piriz 1993).

En los años 90, la compañía Soriano S.A. desarrolló cultivos experimentales de *G. gracilis* en la Patagonia basados en técnicas utilizadas en Chile. Sin embargo, las plántulas se desprendieron y mostraron abundante epifitismo, llegando a la conclusión de que en esa área no pueden reproducirse las técnicas chilenas debido a las fuertes corrientes, por lo que deben desarrollarse nuevas tecnologías (Hayashi et al. 2014).

5.3. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS EN ESPECIES CARRAGENÓFITAS

El aspecto más estudiado en especies carragenófitas explotadas en el país está relacionado con la estructura química de los carragenanos, con numerosas publicaciones en carragenanos de *Gigartina skottsbergii* (Matulewicz et al. 1989; Piriz y Cerezo 1991; Cíancía et al. 1993, 1997; Carlucci et al. 1997; Stortz y Cerezo 2000) y de *Sarcothalia crispata* (Matulewicz y Cerezo 1980; Stortz y Cerezo 1986, 1993; Stortz et al 1994; Fores et al 1997, 2000a, b). Sin embargo, los estudios relacionados con la biología reproductiva de estas especies son escasos. Solo se cuenta con un estudio de la fenología reproductiva en una población de *G. skottsbergii* de Punta Thompson, Chubut, realizado por Piriz (1996). Además de ello, se han llevado a cabo informes técnicos en los que se menciona el uso de las dos especies de carragenófitas explotadas en Argentina y su distribución (Asensi 1981; Piriz y Casas 1996b).

OBJETIVOS

En base a los antecedentes mencionados, se plantea como **objetivo general** de esta tesis el estudio de las macroalgas carragenófitas *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* del Mar Argentino, incluyendo aspectos morfológicos y reproductivos relevantes, con el objeto de obtener información que sirva de base para el desarrollo de futuros

esporocultivos comerciales y para el manejo de praderas naturales. Este estudio también está orientado a la búsqueda de aplicaciones novedosas de los carragenanos extraídos de estas especies.

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. *Gigartina skottsbergii*

- a. Estimar la disponibilidad estacional de esporas de *G. skottsbergii* en una población del sur de Argentina.
- b. Determinar el método de inducción más eficaz para la obtención de carpósporas y tetrásporas.
- c. Determinar las condiciones abióticas óptimas para la obtención de carpósporas y tetrásporas.
- d. Estudiar el proceso de germinación de esporas.
- e. Evaluar el asentamiento y supervivencia de carpósporas y tetrásporas sobre distintos sustratos en laboratorio.

2. *Sarcothalia crispata*

- a. Estimar la disponibilidad de esporas de *S. crispata* en una población del sur de Argentina.
- b. Establecer el método más eficaz para obtener carpósporas y tetrásporas.
- c. Evaluar la germinación de ambos tipos de esporas.
- d. Estudiar la potencialidad de distintos sustratos artificiales y naturales para el asentamiento de esporas en laboratorio.
- e. Estimar la supervivencia y crecimiento de plántulas resultantes de la germinación de esporas sobre distintos sustratos artificiales y naturales.

3. Carragenanos

- a. Extraer y caracterizar los carragenanos de *G. skottsbergii* y *S. crispata* obtenidas de una pradera del sur de Argentina.
- b. Obtener complejos interpolielectrolito con los carragenanos extraídos de cada especie.
- c. Evaluar el desempeño de los complejos interpolielectrolito preparados en la liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

1. SITIO DE MUESTREO

Los ejemplares de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* se recolectaron al norte de Cabo Raso, Chubut, Argentina, en un sitio conocido como Punta Pescadero (65°15'07" O, 44°18'30" S) (Fig. 2.1.a, b). El sitio de recolección de muestras se sitúa en una zona rocosa, expuesta al oleaje (Fig. 2.2.a, b) y generalmente con fuerte movimiento de agua sobre el fondo marino. El lugar se eligió teniendo en cuenta el último relevamiento realizado por Piriz y Casas (1996b), donde se señala a Punta Pescadero como una de las localizaciones más productivas, así como también la presencia de arribazones de *G. skottsbergii* y *S. crispata* en la costa (Fig. 2.2.c).

El material algal se obtuvo por buceo en apnea en el submareal (Fig. 2.2.d, e), entre 3 y 7 metros de profundidad respecto al nivel medio de marea en el caso de *G. skottsbergii*, y entre 1 y 7 metros en el caso de *S. crispata*. La zona se caracteriza por una gran cantidad de algas pardas como *Macrocystis* sp, *Lessonia* sp, *Desmarestia* sp. y *Undaria pinnatifida*, por debajo de las cuales se encuentran los ejemplares de *G. skottsbergii* y *S. crispata*, sobre sustratos duros, acompañadas de otras algas rojas, pardas y verdes (Fig. 2.2.f).

Los talos recolectados fueron escurridos, colocados en bolsas plásticas herméticas y trasladados, dentro de las 24 horas posteriores a la recolección, en contenedores refrigerados al Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA), CERZOS, UNS-CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, donde se realizaron todos los ensayos.

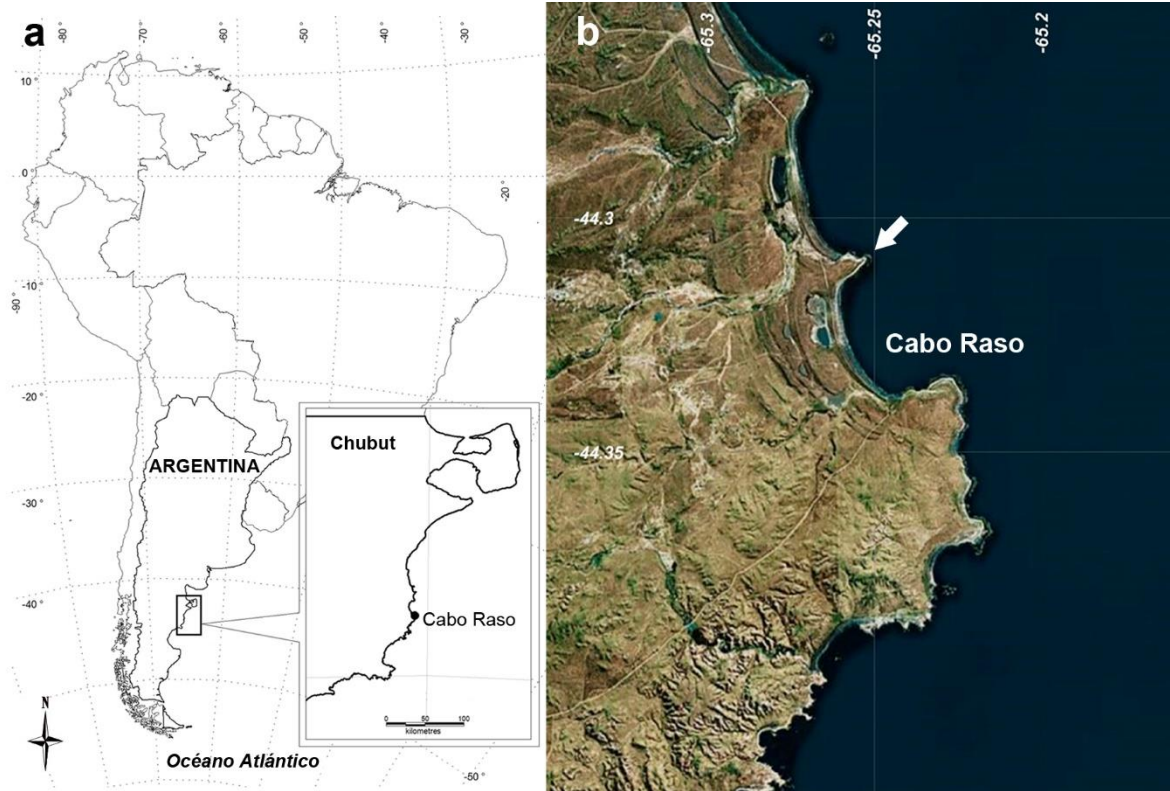


Fig. 2.1. (a) Ubicación del sitio de recolección de los ejemplares de *G. skottsbergii* y *S. crispata*. **(b)** Detalle de la zona; la flecha señala el lugar de recolección.



Fig. 2.2. Sitio de recolección de *G. skottsbergii* y *S. crispata*. **(a, b)** Vistas de Punta Pescadero. **(c)** Arribazón de algas en la zona. **(d, e)** Recolección del material algal mediante buceo en apnea. **(f)** Vista del fondo marino donde se observa un ejemplar de *G. skottsbergii*.

2. TEST DE RESORCINOL

Teniendo en cuenta que en las especies de la Familia Gigartinaceae los gametofitos producen Kappa-carragenano y los tetrasporofitos Lambda-carragenano; esta característica puede ser empleada para distinguir las fases del ciclo de vida. El método del resorcinol (Garbary y De Wreede 1988) permite determinar si un ejemplar es gametofítico o tetrasporofítico usando una pequeña porción del talo.

2.1. PREPARACIÓN DEL REACTIVO RESORCINOL-ACETAL

Reactivos:

- Resorcinol
- HCl
- Acetal (acetaldehído dietil acetal)

Procedimiento:

- 1) Solución stock de resorcinol:
 - a) Se añadieron 150 mg de resorcinol a 100 mL de agua destilada
 - b) Se añadieron 9 mL de la solución 1a a 100 mL de HCl concentrado
- 2) Solución stock de acetal:
 - a) Se añadieron 0,1 mL de acetal a 10 mL de agua destilada
 - b) Se diluyó 1 mL de la solución 2a en 25 mL de agua destilada

Para obtener el reactivo resorcinol-acetal se añadió 1 mL de la solución 2b a la solución 1b.

2.2. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DEL CICLO DE VIDA

El procedimiento se llevó a cabo en una campana de humos. Se cortó un disco del talo de aproximadamente 1 cm² de diámetro y se colocó, previamente enjuagado y secado con papel absorbente, en un tubo de ensayo de 10 mL. Se agregaron 2 mL del reactivo resorcinol-acetal. Se colocó el tubo en un baño de agua a 80-90 °C durante 1 minuto. Luego se retiró el tubo del baño y se observó el color de la reacción: si la solución permaneció incolora se trató de un tetrasporofito (Fig. 2.3.a, b, c); en tanto que si viró a rosa o rojo el ejemplar resultó ser un gametofito (Fig. 2.3.d, e).

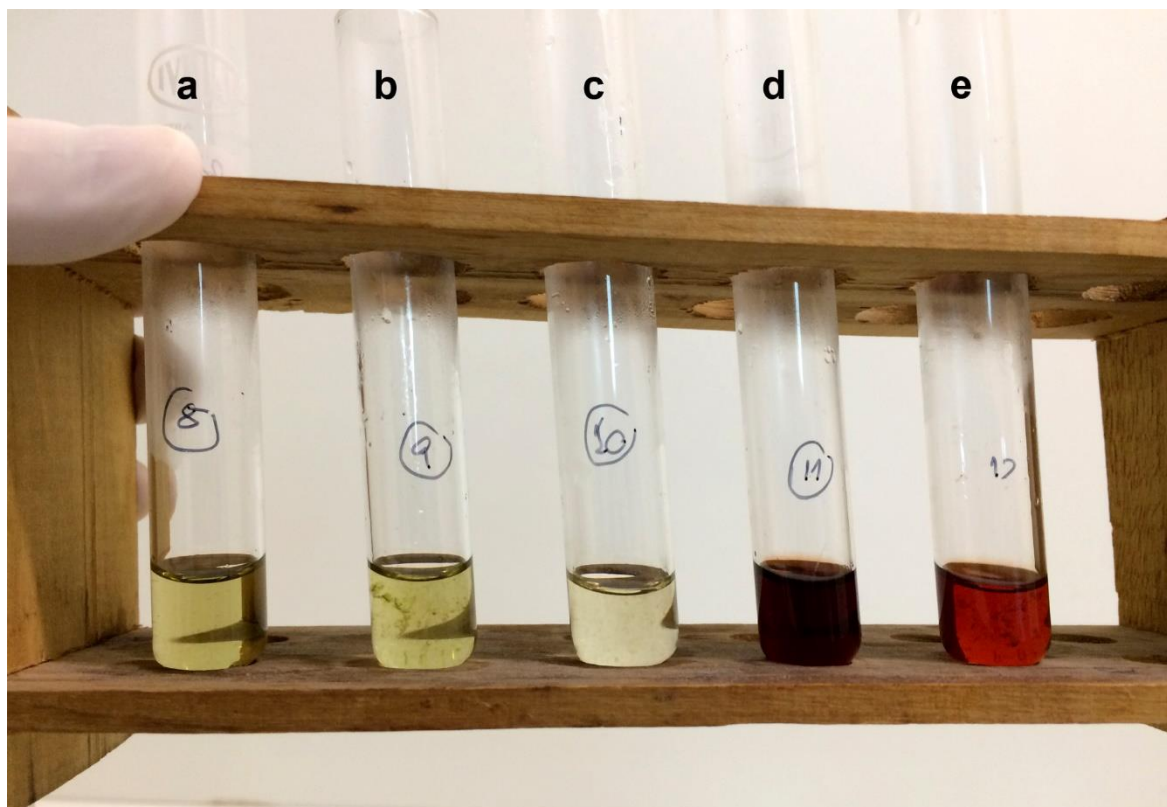


Fig. 2.3. Test de resorcinol para determinar la generación de un ejemplar algal. **(a-c)** Tetrasporofitos. **(d-e)** Gametofitos.

3. MEDIO DE CULTIVO

3.1. RECOLECCIÓN DE AGUA DE MAR

El agua de mar se recogió en bidones de plástico en el mismo sitio de obtención de los ejemplares algales. Ésta tuvo una salinidad de entre 31 y 33, y un pH cercano a 8. La temperatura del agua varió entre 7 °C en el mes de agosto y 16 °C en el mes de marzo.

El agua de mar se dejó madurar en una cámara de frío en oscuridad por al menos cuatro meses antes de su uso. Para preparar el medio de cultivo, el agua se filtró utilizando filtros de celulosa de 1,2 μm y posteriormente de nitrato de celulosa de 0,45 μm . Luego se esterilizó en botellas de vidrio de 1 L (con 500 mL de agua de mar) en autoclave, a 120 °C y a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

3.2. SOLUCIÓN DE ENRIQUECIMIENTO PROVASOLI

En todos los ensayos realizados se utilizó el medio de cultivo Provasoli (PES) (Alveal et al. 1995).

Reactivos:

En la Tabla 2.1 se detallan los reactivos y las cantidades utilizadas para preparar la solución stock del medio de cultivo PES.

Tabla 2.1. Composición de la solución stock del medio de cultivo Provasoli.

	Reactivos	Soluciones en agua destilada	Volúmenes utilizados
1	Na ₂ -glierofosfato.H ₂ O	5 g / 100 mL	16 mL
2	NaNO ₃	5,6 g / 150 mL	150 mL
3	Cianocobalamina (B12)	0,01 g / 100 mL	1.6 mL
4	Tiamina	0,1 g / 100 mL	8 mL
5	Biotina	0,01 g / 100 mL	0,8 mL
6	Tampón-tris	6,5440 g / 150 mL	150 mL
7	FeEDTA:		500 mL
	Na ₂ EDTA	0,2640 g / 500 mL	
	+ Fe(NH ₄) ₂ .6H ₂ O	0,2808 g	
8	Mezcla de metales:	/ 500 mL	500 mL
	Na ₂ EDTA	0,4 g	
	H ₃ BO ₃	0,4480 g	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,0192 g	
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0480 g	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0088 g	
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,0019 g	

Procedimiento:

El volumen resultante de mezclar todas las soluciones detalladas previamente se llevó a 2 L con agua destilada y se ajustó el pH a 7,5-8,5 con HCl. Posteriormente se

separaron alícuotas de 40 mL, las cuales se almacenaron en tubos plásticos a -20 °C hasta su uso.

3.3. DIÓXIDO DE GERMANIO

Para evitar la proliferación de diatomeas en los cultivos se añadieron 4 mL de dióxido de germanio (GeO_2) por cada litro de medio de cultivo. La preparación de la solución de GeO_2 se realizó según Lewin (1966).

3.3.1. Preparación de la solución de GeO_2

Reactivos:

- NaOH
- GeO_2
- HCl

Procedimiento:

Se disolvieron 4 g de NaOH en 200 mL de agua bidestilada. Se calentó hasta ebullición. Se retiró del mechero y se agregó 1 g de GeO_2 . Se volvió a calentar y se dejó enfriar. Se llevó a 500 mL con agua bidestilada y se ajustó el pH a 7,5 con HCl concentrado. Se llevó a 1 L con agua bidestilada y se guardó en una botella plástica en heladera hasta su uso.

3.4. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La solución stock y el GeO_2 se filtraron con filtros estériles de nitrato de celulosa de 0,2 μm y se añadieron al agua de mar, previamente esterilizada en autoclave, en un gabinete de flujo laminar para evitar contaminación. Se utilizaron 20 mL de solución stock por litro de agua de mar. El medio de cultivo preparado se conservó en heladera hasta su uso.

4. ENSAYOS DE LABORATORIO

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio. Los cultivos se iniciaron en Erlenmeyers o cajas de Petri de vidrio estériles, y se mantuvieron en cámara de cultivo con las condiciones de temperatura, intensidad lumínica y fotoperiodo necesarias para cada ensayo, las cuales se detallan en los respectivos capítulos. La luz fue provista por tubos

fluorescentes Philips L-35 de luz blanca y la densidad de flujo de fotones se midió con un sensor subacuático LI-COR modelo LI-192 SB. La renovación del medio de cultivo y cualquier otra manipulación de los mismos fue realizada en un gabinete de flujo laminar para evitar la contaminación.

4.1. MATERIAL DE VIDRIO

El material de vidrio utilizado en los ensayos (Erlenmeyers, cajas de Petri, pipetas, etc.) se lavó con detergente no iónico 1%, se enjuagó con agua corriente repetidas veces y finalmente con agua destilada. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 °C y una atmósfera de presión durante 30 minutos.

5. OTROS MÉTODOS

5.1. RECuento DE ESPORAS

En los ensayos de liberación de esporas, se realizaron recuentos diarios de las esporas liberadas. Para ello, las suspensiones de esporas colectadas diariamente se preservaron con una gota de lugol en frascos plásticos. Por cada réplica se tomaron dos alícuotas de 1 mL, las cuales se colocaron en una cámara de conteo de Sedgewick-Rafter (Fig. 2.4.a) y se contaron las esporas bajo microscopio óptico con 10x de magnificación. Para ello se realizaron recuentos de las esporas presentes en 10 cuadrados al azar de la cámara de conteo y el valor obtenido se extrapoló a 1 mL (la cámara utilizada posee 40 cuadrados en total).

En los casos en que las suspensiones estuvieron muy concentradas (más de 1000 esporas por cuadrado, Fig, 2.4.b), se prepararon diluciones de las mismas con agua de mar filtrada y luego se multiplicó la cantidad contada por el factor de dilución.

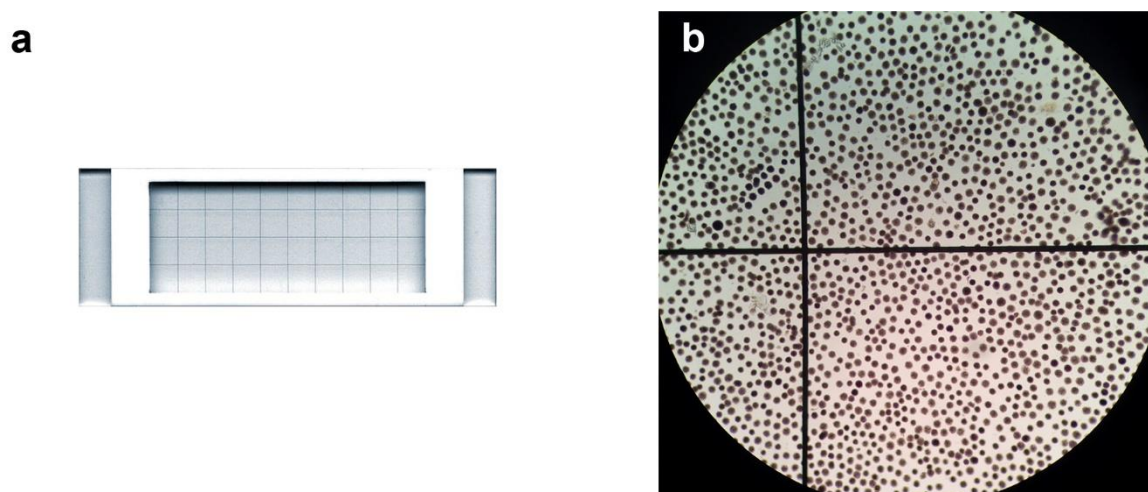


Fig. 2.4. Metodología de recuento de esporas. **(a)** Cámara de Sedgewick-Rafter. **(b)** Cámara de conteo con la suspensión de esporas observada con una magnificación de 10x en microscopio óptico.

5.2. MEDICIONES

Todas las medidas tomadas en microscopio óptico se realizaron con un ocular micrométrico.

Las mediciones (densidad, área, longitud) realizadas sobre fotografías tomadas en lupa binocular se realizaron con el software de análisis de imágenes Digimizer 5.3.3. (Digimizer 2018).

CAPÍTULO 3

***Gigartina skottsbergii*:**
disponibilidad estacional, liberación y
germinación de esporas

1. INTRODUCCIÓN

Gigartina skottsbergii Setchell & N. L. Gardner es una especie endémica de Sudamérica meridional, Antártida e islas subantárticas (Hommersand et al. 2009). Los talos tienen forma orbicular, son gruesos y cartilaginosos, de color rojo oscuro, y pueden alcanzar los 60 cm de diámetro (Boraso de Zaixso et al. 2013). Estos talos crecen sobre sustratos duros, a los que se fijan por procesos rizoidales ubicados en la cara abaxial, razón por la cual los individuos crecen paralelamente al sustrato (Boraso de Zaixso et al. 2013). Los cistocarpos se desarrollan sobre el gametofito femenino dentro de papilas pediceladas, mientras que los soros tetrasporangiales se desarrollan inmersos en el tetrasporofito (Kim 1976).

En la Patagonia argentina *G. skottsbergii* tiene una distribución amplia pero discontinua, desde Punta Lobería en Chubut, hasta Tierra del Fuego (Piriz y Casas 1996), encontrándose en el submareal entre los tres y once metros de profundidad, en zonas con fuertes corrientes de fondo (Boraso de Zaixso et al. 2015). Las investigaciones sobre esta especie en nuestro país se han centrado en la fenología de una población en la provincia del Chubut (Piriz, 1996) y en la caracterización química de sus carragenanos (Matulewicz et al. 1989; Piriz y Cerezo 1991; Ciancia et al. 1993, 1997; Stortz y Cerezo 2000). En este último aspecto, también se ha estudiado la actividad biológica de sus carragenanos, demostrándose que estos galactanos aislados de talos cistocárpicos y tetraspóricos y sus derivados son potentes inhibidores del virus del herpes simplex (Carlucci et al. 1997). Sin embargo, los estudios relacionados con aspectos reproductivos y de crecimiento son escasos, limitándose a observaciones a campo.

Gigartina skottsbergii constituye uno de los recursos algales más importantes del Mar Argentino y ha sido explotada para la producción de carragenanos desde la década del 70 (Boraso de Zaixso 1998), a través de una concesión otorgada a la Empresa Soriano S.A. para la recolección de las algas exclusivamente a partir de arribazones. Sin embargo, al ser la biomasa algal insuficiente para satisfacer la demanda del mercado interno, la empresa recurrió a la importación de *Kappaphycus* procedente de Filipinas.

Las poblaciones de *G. skottsbergii* en la costa chilena también son explotadas para la industria de carragenanos y se han realizado numerosos estudios en cuanto a la fenología de poblaciones naturales (Zamorano y Westermeier 1996; Avila et al. 1997, 1999b; Westermeier et al. 1999), experiencias de cultivo vegetativo (Correa et al. 1999; Buschmann et al. 2004; Romo et al. 2006; Hernández-González et al. 2007; Westermeier

et al. 2012) y de esporocultivos (Avila et al. 1999b; Buschmann et al. 1999; Mansilla et al. 2006, 2008; Roleda et al. 2008; Marambio et al. 2014). La intensa actividad de recolección de esta especie ha resultado en una sobre-explotación en algunas localidades (Correa et al. 1999; Westermeier et al. 1999), lo que ha conducido al desarrollo de estrategias de manejo de las praderas naturales (Marín et al. 2002), así como también de técnicas de cultivo y repoblamiento que han sido publicadas en numerosos manuales (Romo et al. 2004; Avila et al. 2012; Candia y Núñez 2013).

Estudios realizados en *G. skottsbergii* en la costa pacífica de Sudamérica exponen como ventajas de su cultivo la calidad de los carragenanos, su sanidad y el alto potencial reproductivo y de regeneración; mientras que mencionan como desventajas la baja tasa de crecimiento comparada con otras especies carragenófitas, así como también la limitada disponibilidad de esporas y la elevada mortalidad de los estadios juveniles (Buschmann et al. 2001a).

En base a estos antecedentes, se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Estimar la disponibilidad estacional de carpósporas y tetrásporas de *G. skottsbergii* a lo largo de dos años en una población de Cabo Raso, Chubut.
2. Evaluar si la exposición de las frondes fértiles a desecación o alta salinidad como métodos de inducción, aumenta la liberación de carpósporas y tetrásporas.
3. Determinar las condiciones de fotoperiodo y temperatura óptimas para la obtención de carpósporas y tetrásporas.
4. Estudiar el proceso de germinación de las esporas con microscopía óptica.
5. Evaluar el asentamiento y supervivencia de carpósporas y tetrásporas sobre distintos sustratos (vidrio, conchillas, piedras) en laboratorio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MADUREZ DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS Y DISPONIBILIDAD ESTACIONAL DE ESPORAS

Se recolectaron diez talos cistocárpicos y diez tetraspóricos de *G. skottsbergii* en cada una de las cuatro estaciones del año, durante dos años consecutivos: marzo, mayo, agosto y octubre de 2015 y febrero, mayo, agosto y octubre de 2016. Las frondes se

cosecharon en el submareal, a 3-7 metros por debajo del nivel medio de marea. Los talos se transportaron al laboratorio donde se realizaron los correspondientes ensayos.

Si bien las fases del ciclo de vida fueron fácilmente distinguibles a simple vista, se corroboró la fase de cada fronde utilizando el método del Resorcinol.

2.1.1. Densidad de cistocarpos y soros tetrasporangiales

Para cada fase del ciclo de vida y en cada fecha se determinó la densidad de estructuras reproductivas mediante el recuento del número de cistocarpos o soros tetrasporangiales en cinco campos aleatorios de 150 mm² en cada fronde, a partir de micrografías tomadas en lupa binocular. Estos datos se expresaron como densidad de estructuras por cm² de fronde.

En los talos cistocárpicos se contaron el número de cistocarpos, de papilas y de cicatrices. En los tetrasporofitos se contaron el número de soros inmaduros, maduros y vacíos, según la siguiente escala colorimétrica: marrón claro (inmaduros), marrón oscuro-negro (maduros), blanco (vacíos) (Santelices y Martínez 1997; Avila et al. 1999b)

2.1.2. Tamaño de cistocarpos y soros tetrasporangiales

En cada fecha se midió el diámetro de los cistocarpos en talos cistocárpicos y el ancho de los soros en talos tetraspóricos. Esto se realizó en micrografías tomadas con lupa binocular de cortes transversales de papilas con cistocarpos y de tetrasporofitos.

2.1.3. Liberación de carpósporas y tetrásporas

Se iniciaron ensayos de liberación de esporas en laboratorio para evaluar la disponibilidad de carpósporas y tetrásporas en cada fecha de recolección. Para ello se cortaron con un sacabocado fragmentos circulares de frondes cistocárpicas y tetraspóricas, los cuales se limpiaron con un cepillo de cerda y agua de mar estéril para remover detritos y epífitos. En cada caja de Petri se colocaron seis fragmentos de fronde cistocárpica o tetraspórica con una cantidad conocida de cistocarpos o soros, y se agregaron 10 mL de medio de cultivo PES. Se utilizaron cinco réplicas por cada tipo de fronde y se incubaron a 10 ± 1 °C, 12:12 (Luz:Oscuridad) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3.1.a). El medio de cultivo se renovó cada 24 h, preservando el medio con esporas con una gota de Lugol en frascos plásticos para su posterior recuento (Fig. 3.1.b). Para cada réplica, se contaron las esporas presentes en dos alícuotas de 1 mL. Este procedimiento se repitió durante siete días.

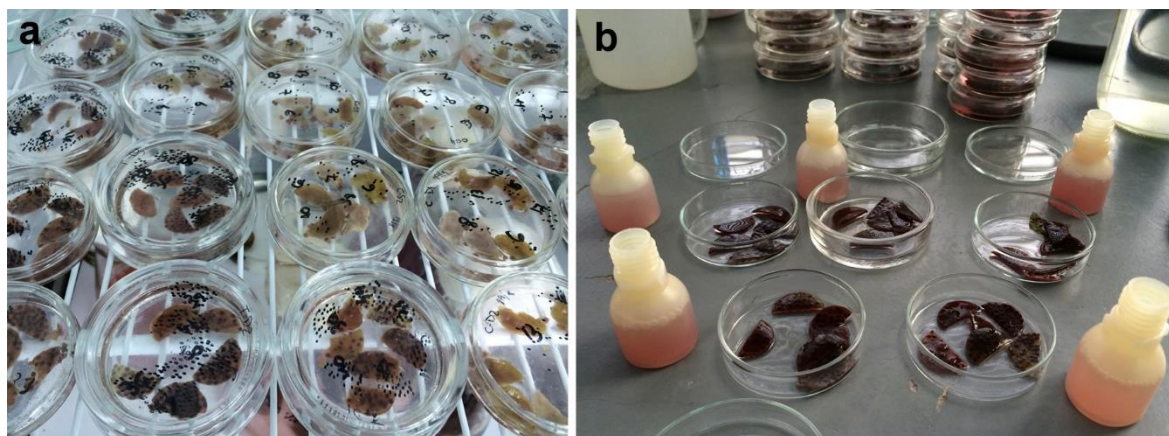


Fig. 3.1. Ensayo de liberación de esporas. **(a)** Cajas de Petri con fragmentos de frondes en una cámara de cultivo con condiciones controladas de temperatura, intensidad lumínica y fotoperiodo. **(b)** Renovación del medio de cultivo y almacenamiento de la suspensión de esporas para su posterior recuento.

2.1.4. Tamaño de carpósporas y tetrásporas

Se realizaron mediciones del diámetro de las carpósporas y tetrásporas liberadas. Para ello se colocaron fragmentos de talos cistocárpicos y tetraspóricos maduros en Erlenmeyers con medio de cultivo PES y, una vez liberadas las esporas se tomaron alícuotas de las suspensiones de carpósporas y tetrásporas y se midieron en un microscopio óptico con un ocular micrométrico.

2.2. LIBERACIÓN DE ESPORAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la disponibilidad estacional de esporas, se realizaron ensayos en las épocas de mayor esporulación, durante 2016 y 2017, para evaluar distintos factores que podrían afectar a la liberación de carpósporas y tetrásporas.

2.2.1. Métodos de inducción

Se evaluaron tres métodos de inducción de la liberación de esporas. Para ello, fragmentos circulares de frondes cistocárpicas y tetraspóricas se limpiaron para remover detritos y epifitos, como se mencionó previamente. Luego se separaron aleatoriamente en tres grupos para aplicar los tratamientos.

Los métodos evaluados fueron: 1) liberación espontánea (control): no se aplicó ningún tratamiento a las frondes; 2) desecación: los fragmentos de talo se dejaron secar

parcialmente durante una hora sobre papel absorbente en oscuridad; 3) shock osmótico: los fragmentos se colocaron durante una hora en agua de mar con alta salinidad (60).

Luego de aplicar los tratamientos, seis fragmentos con un número conocido de cistocarpos o soros tetrasporangiales, fueron colocados en una cada caja de Petri con 10 mL de medio de cultivo PES y se incubaron a 10 ± 1 °C, 12:12 (Luz:Oscuridad) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se emplearon cinco réplicas por tipo de fronde y tratamiento. Cada 24 h y durante siete días se renovó el medio de cultivo y se contaron las esporas presentes en dos alícuotas de 1 mL de cada suspensión de esporas.

2.2.2. Temperatura

Se evaluó la liberación de esporas a 6, 11 y 16 °C. Para ello se siguió el procedimiento mencionado previamente: seis fragmentos de un centímetro de diámetro de frondes cistocárpicas o tetraspóricas, previamente cepillados y enjuagados con agua de mar estéril, se colocaron por cada caja de Petri con 10 mL de medio de cultivo PES. Se utilizaron cinco réplicas por tipo de fronde y temperatura. Las cajas de Petri se incubaron en tres cámaras de cultivo con las temperaturas indicadas, 12:12 (Luz:Oscuridad) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante siete días. Cada 24 h se renovó el medio de cultivo y se realizaron recuentos por duplicado de las esporas contenidas en 1 mL de medio.

2.2.3. Fotoperiodo

Se evaluó la liberación de esporas en tres fotoperiodos diferentes: corto: 8:16 (Luz:Oscuridad), neutro: 12:12 (L:O), y largo: 16:8 (L:O). Para ello se siguió el mismo procedimiento empleado para evaluar la liberación de esporas bajo distintas temperaturas, incubando las cajas de Petri en cámaras de cultivo con los fotoperiodos mencionados, a 10 ± 1 °C y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante siete días.

Cabe aclarar que, como durante 2016 el material tetraspórico no fue abundante para realizar todos los ensayos planificados, solamente se evaluaron dos fotoperiodos (corto y neutro, utilizando este último como control). Al año siguiente y en la misma época del año se realizó el ensayo correspondiente con los fotoperiodos largo y neutro. Por su parte, el material cistocárpico sí resultó suficiente en 2016, por lo que se evaluaron los tres fotoperiodos simultáneamente.

2.3. GERMINACIÓN

El proceso de germinación de carpósporas y tetrásporas se estudió mediante la incubación de esporas sobre cubreobjetos de vidrio en cajas de Petri con medio de cultivo

PES, a 10 ± 1 °C, 12:12 (L:O) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los cubreobjetos se observaron periódicamente en un microscopio óptico. Las mediciones se realizaron con un ocular micrométrico.

2.4. EXPERIENCIAS DE ESPOROCULTIVO SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS

Para evaluar el asentamiento de esporas sobre distintos sustratos se prepararon inóculos de carpósporas y tetrásporas. Para ello se cortaron fragmentos circulares de talos cistocárpicos y tetraspóricos maduros, los cuales se limpiaron con pincel de cerda y agua de mar estéril. Posteriormente se colocaron alrededor de 35 gramos de cada tipo de fronde en Erlenmeyers con 500 mL de medio de cultivo PES y se los dejó durante aproximadamente 20 h en una cámara de cultivo a 10 ± 1 °C, 12:12 (L:O) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los Erlenmeyers con las suspensiones de esporas fueron agitados regularmente para evitar la fijación de las esporas al vidrio.

Se iniciaron esporocultivos *in vitro* para evaluar la aptitud de distintos sustratos para la fijación y desarrollo de carpósporas y tetrásporas de *G. skottsbergii*. Se evaluó un sustrato artificial y tres sustratos naturales: 1) cubreobjetos de vidrio utilizados como control (vidrio); 2) conchillas de mejillones (mejillones); 3) conchillas de almejas (almejas) y 4) piedras. Se eligieron estos sustratos naturales ya que fueron los observados en la naturaleza donde se encontraron fijados los ejemplares de *G. skottsbergii*.

Se usaron cinco cajas de Petri por cada tipo de espora y sustrato. Se colocaron los sustratos sobre el fondo de las cajas de Petri, y se agregaron 20 mL del correspondiente inóculo y 20 mL de medio de cultivo PES, de manera que los sustratos estuvieran cubiertos de medio. Las cajas de Petri se incubaron a 10 ± 1 °C, 12:12 (L:O) y 25 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y el medio de cultivo se renovó semanalmente.

Cada semana se tomaron tres micrografías de cada caja de Petri bajo lupa binocular, en las cuales se contaron la cantidad de esporas asentadas y se expresaron como esporas cm^{-2} .

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como media \pm error estándar. Los recuentos estacionales de esporas se compararon entre fechas y entre tipos de talo mediante pruebas t de Student. La liberación total de esporas se comparó entre métodos de inducción y tipos de fronde mediante un ANOVA doble, al igual que las esporas totales liberadas entre distintas temperaturas y tipos de fronde. Las esporas totales liberadas entre distintos

fotoperiodos se compararon con un ANOVA simple, mientras que para la comparación de las tetrásporas totales liberadas entre fotoperiodo corto y el control y entre fotoperiodo largo y control se utilizaron pruebas t de Student. Los conteos de esporas se transformaron con raíz cuadrada cuando fue necesario para lograr normalidad y homocedasticidad.

Para comparar la densidad de esporas entre los distintos sustratos se realizaron ANOVAs simples. Como la densidad inicial de carpósporas presentó heterocedasticidad y no se pudo mejorar transformando los datos, se realizaron comparaciones entre los sustratos mediante el test no paramétrico de Behrens Fisher.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software R 3.4.3 (R Core Team 2017).

3. RESULTADOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Gigartina skottsbergii se encontró exclusivamente en el submareal, a partir de los 3 m de profundidad, generalmente bajo las frondes de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia vadosa* (Fig. 3.2.a). Los talos, de forma orbicular y hasta 50 cm de diámetro, presentaron textura coriácea y color rojo oscuro (Fig. 3.2.b). La superficie de la fronde en ocasiones resultó lisa (Fig. 3.2.c) o pudo presentar papilas (Fig. 3.2.d, e), que generalmente aparecieron en la cara adaxial. Estas papilas presentaron distintas formas, siendo reproductivas (Fig. 3.2.d), y conteniendo uno o varios cistocarpos; o vegetativas (Fig. 3.2.e), con formas y tamaños diversos. Las papilas vegetativas se observaron tanto en gametofitos como en tetrásporofitos. Los ejemplares estuvieron fijados a sustratos duros (conchillas, piedras) mediante rizoides ubicados en un sector de la cara abaxial de la fronde (Fig. 3.2.f).

En corte transversal, el talo presentó una zona cortical con células pequeñas y pigmentadas, y una zona medular con células de paredes gruesas y menor pigmentación (Fig. 3.2.g).

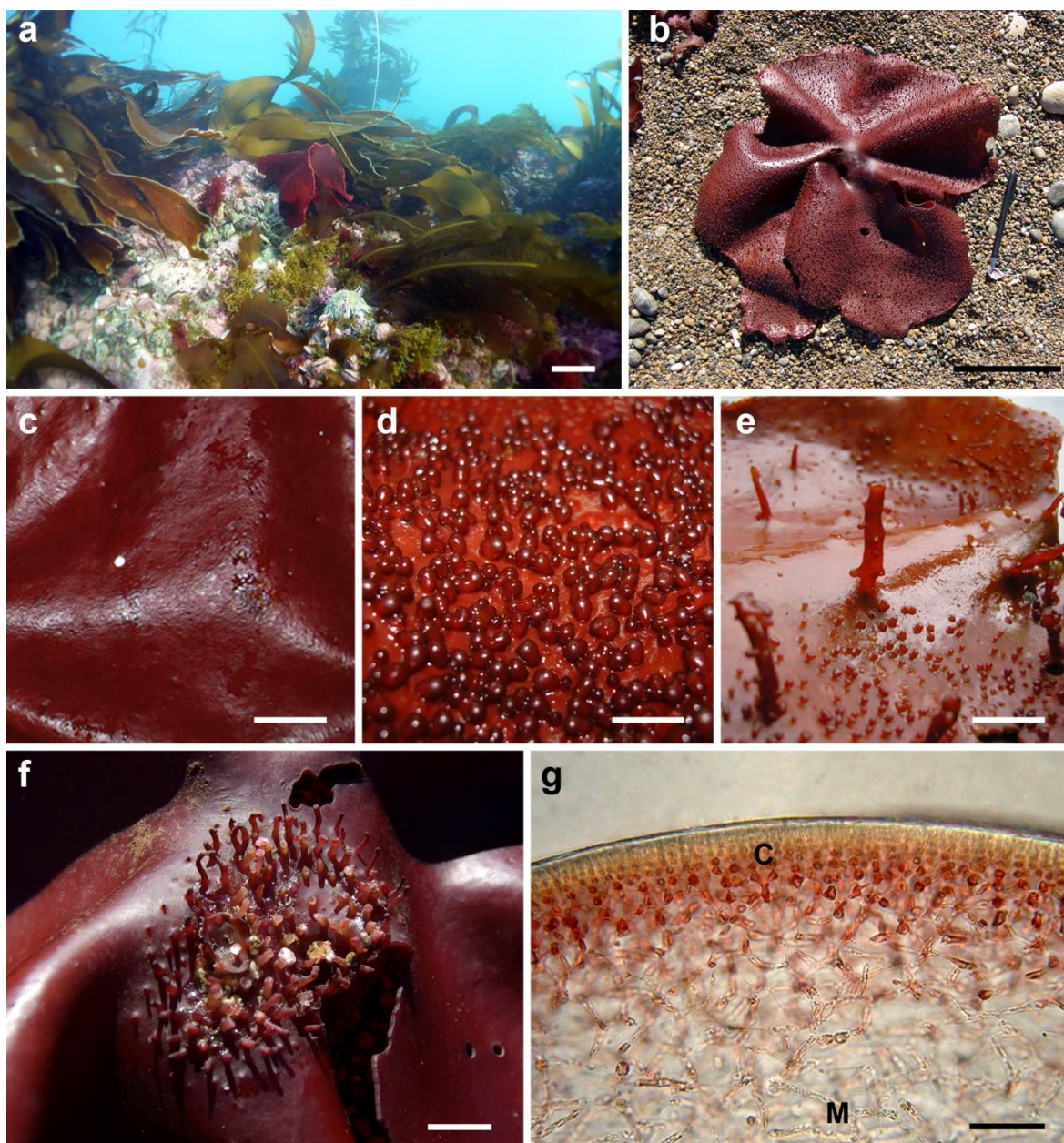


Fig. 3.2. *Gigartina skottsbergii*. **(a)** Un ejemplar de la especie en su hábitat natural. **(b)** Vista macroscópica de una fronde. Superficie de la fronde **(c)** lisa, **(d)** con papilas reproductivas y **(e)** con papilas y proyecciones vegetativas. **(f)** Rizoides en la cara abaxial de la fronde. **(g)** Corte transversal del talo donde se observa la zona cortical (C) y medular (M). Barras escala: a, b = 15 cm; c-f = 1 cm; g = 50 µm.

3.2. MADUREZ DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS Y LIBERACIÓN ESTACIONAL DE ESPORAS

Los talos cistocárpicos y tetraspóricos resultaron fácilmente distinguibles a simple vista entre sí y con respecto a los talos vegetativos.

Los talos cistocárpicos (Fig. 3.3.a) presentaron papilas pediceladas, conteniendo cada una de ellas desde uno hasta cinco cistocarpos (Fig. 3.3.b, c, d). La liberación de carpósporas a partir de cistocarpos maduros se produjo a través de un ostiolo (Fig. 3.3.e), por el cual se liberaron envueltas en mucílago (Fig. 3.3.e, f).

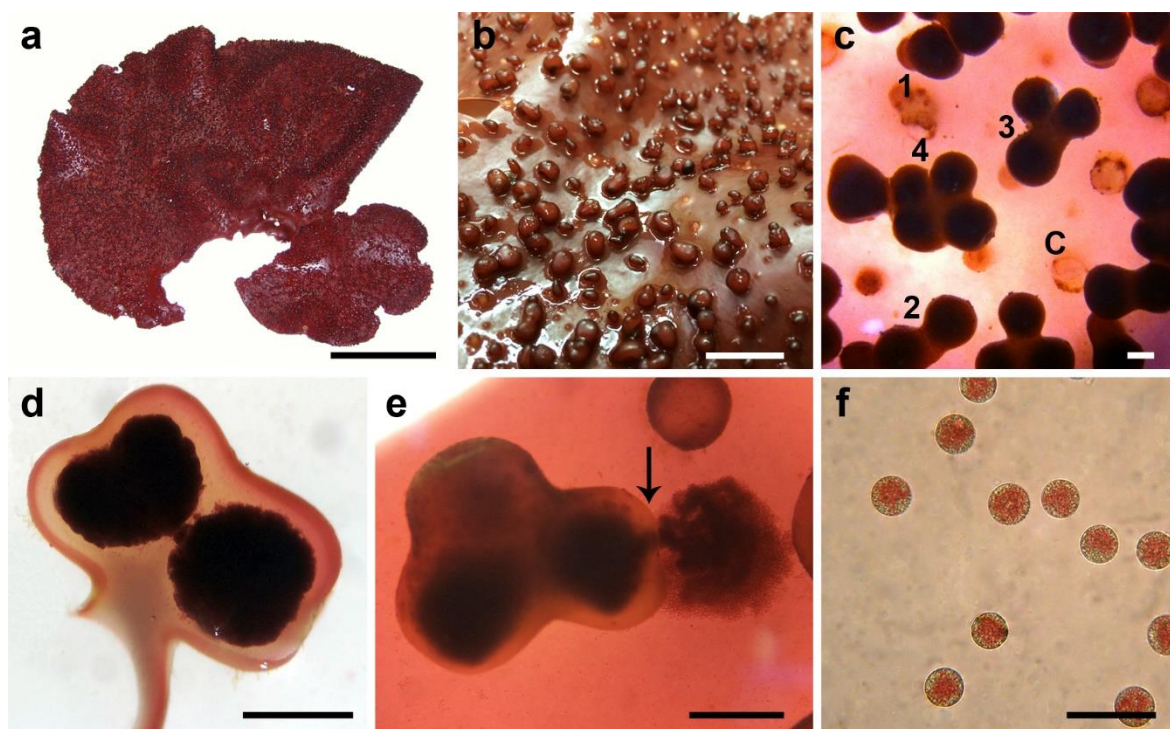


Fig. 3.3. *Gigartina skottsbergii*. **(a)** Fronde cistocárpica. **(b)** Superficie de la fronde con numerosas papilas. **(c)** Fronde observada a trasluz donde se observan papilas con uno (1), dos (2), tres (3) y cuatro (4) cistocarpos, y cicatrices (C). **(d)** Corte transversal de una papila con dos cistocarpos. **(e)** Liberación de carpósporas a partir del cistocarpo a través de un ostiolo (flecha). **(f)** Carpósporas recientemente liberadas.

Los talos tetraspóricos o tetrasporofitos (Fig. 3.4.a) presentaron numerosos soros tetrasporangiales inmersos en el talo (Fig. 3.4.b), los cuales pudieron diferenciarse en soros inmaduros (de color marrón claro), maduros (de color marrón oscuro o negro) y vacíos (blanco), cuando ya se liberaron las tetrásporas (Fig. 3.4.c). En corte transversal de la fronde se pudo observar que los soros se desarrollaron en la zona medular (Fig. 3.4.d). La liberación de tetrásporas ocurrió a través de un poro, ubicado en el centro del soro tetrasporangial (Fig. 3.4.b, e). Las tetrásporas, esféricas, resultaron de menor tamaño que las carpósporas (Fig. 3.4.f).

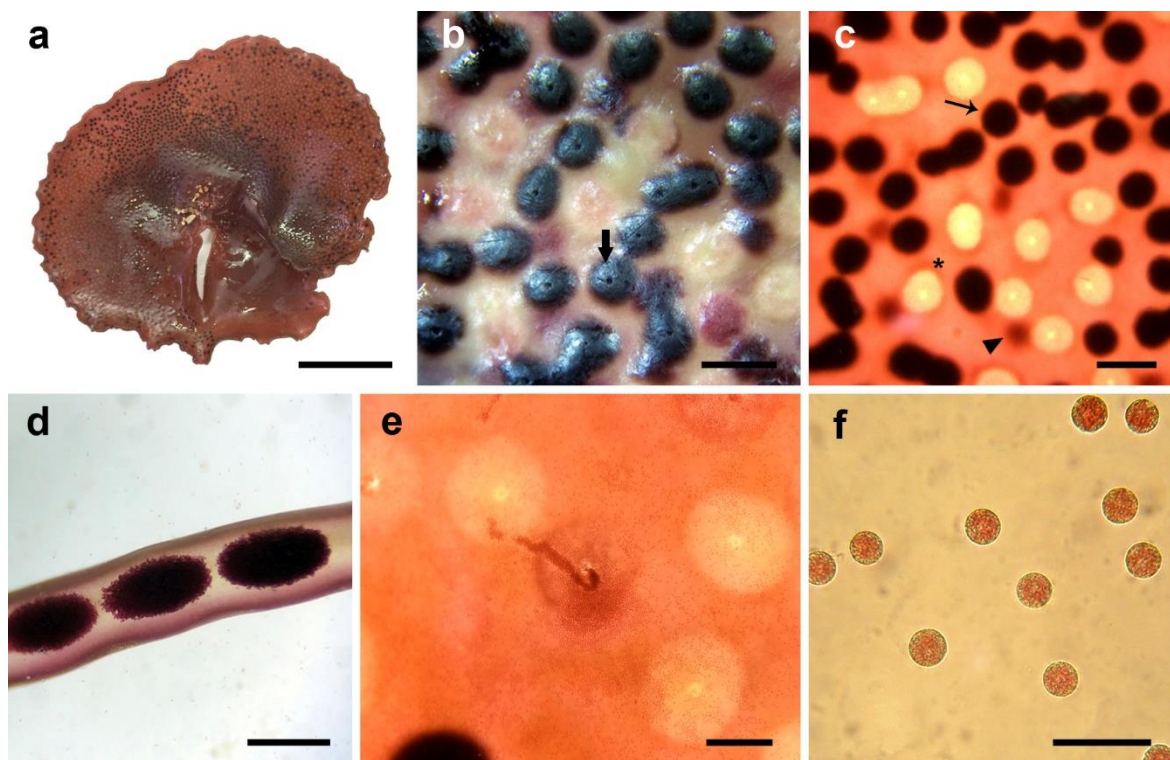


Fig. 3.4. *Gigartina skottsbergii*. **(a)** Fronde tetraspórica o tetrasporofito. **(b)** Superficie de la fronde con numerosos soros tetrasporangiales. La flecha indica un poro. **(c)** Fronde observada a trasluz donde se observan soros inmaduros (punta de flecha), maduros (flecha) y vacíos (asterisco). **(d)** Corte transversal del talo con soros maduros. **(e)** Liberación de tetrásporas a partir de un soro a través de un poro. **(f)** Tetrásporas.

3.2.1. Densidad de estructuras reproductivas

La densidad de cistocarpos sobre los gametofitos femeninos (Fig. 3.5; Tabla 3.1) resultó mayor durante los meses de verano y otoño, con alrededor de 8 cistocarpos / cm². La densidad comenzó a disminuir en invierno llegando a un mínimo en primavera en ambos años evaluados, con menos de 1 cistocarpo / cm².

La densidad de papilas no mostró una tendencia marcada a lo largo del año, siendo mayor en primavera de 2015 y verano de 2016, con más de 9 papilas / cm² (Fig. 3.5; Tabla 3.1).

Las cicatrices en el talo, asociadas a la pérdida de las papilas luego de la liberación de carpósporas a partir de los cistocarpos, presentaron una densidad constante a lo largo del año con entre 1 y 2,5 cicatrices / cm² (Fig. 3.5; Tabla 3.1).

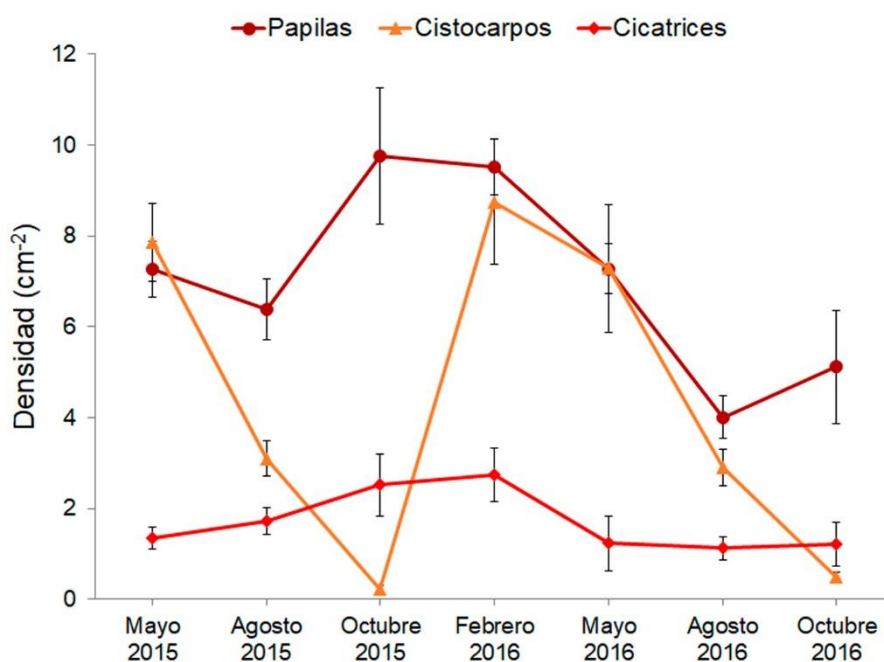


Fig. 3.5. Densidad de papilas, cistocarpos y cicatrices presentes en talos cistocárpicos en las diferentes estaciones del año. Los datos representan la media \pm error estándar para $n = 10$.

Tabla 3.1. Densidad de papilas, cistocarpos y cicatrices en talos cistocárpicos en las diferentes estaciones del año. Los valores representan la densidad media \pm error estándar para $n = 10$.

Fecha	Papilas (cm ⁻²)	Cistocarpos (cm ⁻²)	Cicatrices (cm ⁻²)
Mayo 2015	7,26 \pm 0,62	7,85 \pm 0,85	1,35 \pm 0,24
Agosto 2015	6,38 \pm 0,67	3,10 \pm 0,40	1,73 \pm 0,30
Octubre 2015	9,76 \pm 1,49	0,23 \pm 0,08	2,52 \pm 0,69
Febrero 2016	9,52 \pm 0,61	8,75 \pm 1,38	2,75 \pm 0,58
Mayo 2016	7,28 \pm 0,54	7,29 \pm 1,41	1,23 \pm 0,60
Agosto 2016	4,01 \pm 0,47	2,90 \pm 0,41	1,12 \pm 0,27
Octubre 2016	5,12 \pm 1,25	0,50 \pm 0,11	1,22 \pm 0,47

La densidad de soros tetrasporangiales maduros mostró picos en ambos años durante invierno, con 9 y 13 soros maduros / cm² para 2015 y 2016, respectivamente (Fig. 3.6.a; Tabla 3.2). Por su parte, los soros vacíos mostraron picos durante primavera, con 33 y 34 soros vacíos / cm² para 2015 y 2016, respectivamente (Fig. 3.6.a; Tabla 3.2). La mayor

densidad de soros inmaduros se registró en mayo para ambos años, con alrededor de 15 y 33 soros / cm² para 2015 y 2016, respectivamente (Fig. 3.6.a; Tabla 3.2). Se registraron entre 32 y 49 soros totales / cm² de fronde tetraspórica (Fig. 3.6.a; Tabla 3.2).

En ambos años se registró la mayor proporción de soros maduros durante invierno, con alrededor del 30% de los soros totales en estado maduro, mientras que la preponderancia de soros inmaduros se dio en otoño, con alrededor del 40% del total en 2015 y 90% del total en 2016 (Fig. 3.6.b). Las proporciones de soros maduros e inmaduros disminuyeron en primavera, registrando vacíos alrededor del 70% de los soros totales (Fig. 3.6.b).

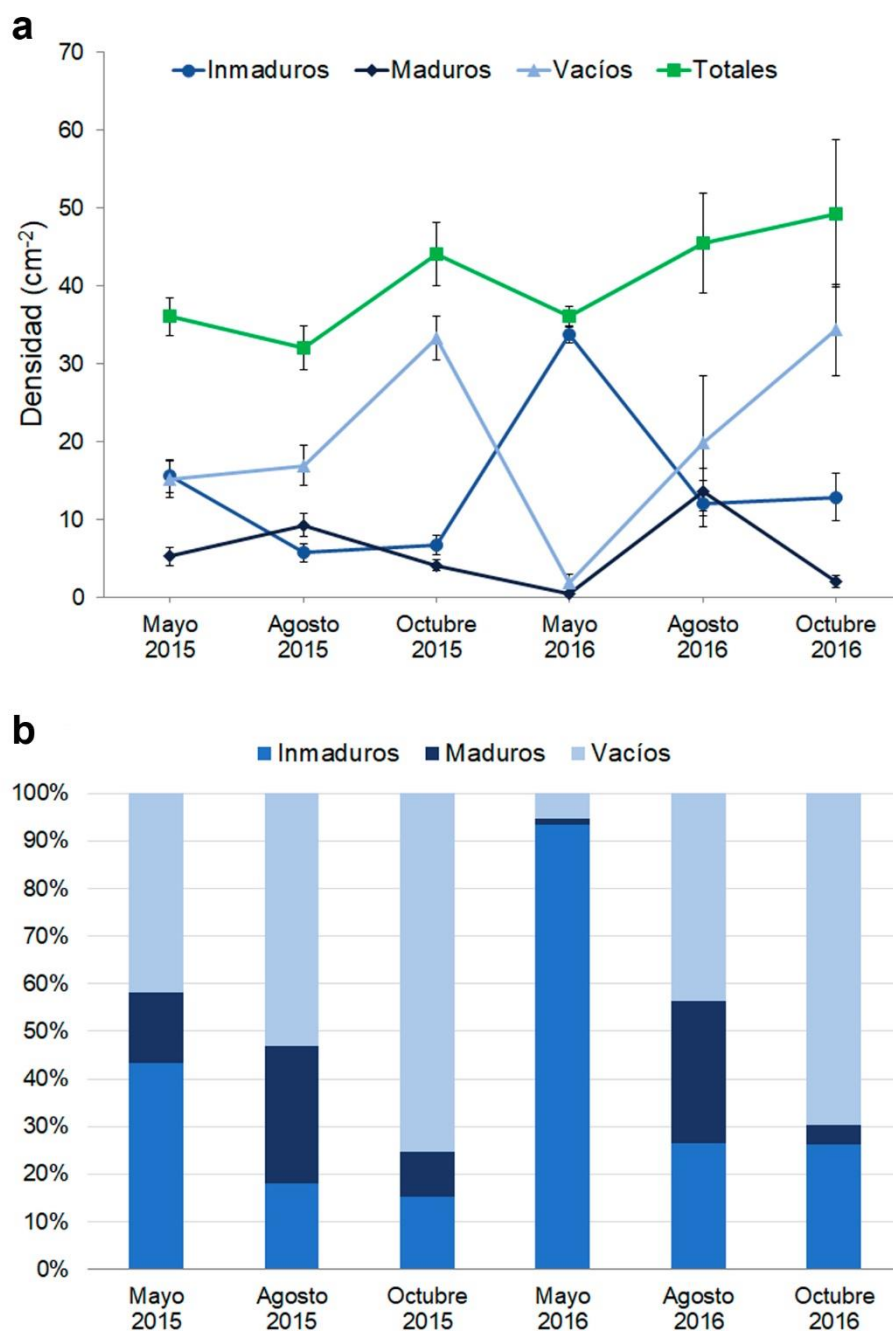


Fig. 3.5. Soros tetrasporangiales en las diferentes estaciones del año. **(a)** Densidad de soros inmaduros, maduros, vacíos y totales en talos tetraspóricos (media \pm error estándar para $n=10$). **(b)** Proporción de soros inmaduros, maduros y vacíos.

Tabla 3.2. Densidad de soros tetrasporangiales inmaduros, maduros, vacíos y totales en talos tetraspóricos en las diferentes estaciones del año. Los valores representan la densidad media (cm^{-2}) \pm error estándar para $n = 10$.

Fecha	Soros (cm^{-2})			
	Inmaduros	Maduros	Vacíos	Totales
Mayo 2015	15,62 \pm 2,13	5,30 \pm 1,17	15,13 \pm 2,33	36,04 \pm 2,46
Agosto 2015	5,73 \pm 1,20	9,31 \pm 1,47	16,97 \pm 2,57	32,01 \pm 2,84
Octubre 2015	6,68 \pm 1,26	4,16 \pm 0,70	33,26 \pm 2,81	44,10 \pm 4,01
Mayo 2016	33,73 \pm 1,00	0,47 \pm 0,39	1,88 \pm 1,08	36,08 \pm 1,23
Agosto 2016	12,07 \pm 3,01	13,59 \pm 3,06	19,81 \pm 8,71	45,47 \pm 6,39
Octubre 2016	12,90 \pm 3,08	2,04 \pm 0,72	34,33 \pm 5,90	49,28 \pm 9,44

3.2.2. Tamaño de estructuras reproductivas

Los cistocarpos presentaron un diámetro de entre 0,99 y 1.74 mm, presentando mayor tamaño durante los meses de invierno y primavera, y menor tamaño en verano (Fig. 3.7; Tabla 3.3).

El tamaño de los soros tetrasporangiales no mostró un patrón marcado a lo largo del año, midiendo entre 1,05 y 1.57 mm de ancho (Fig. 3.7; Tabla 3.3).

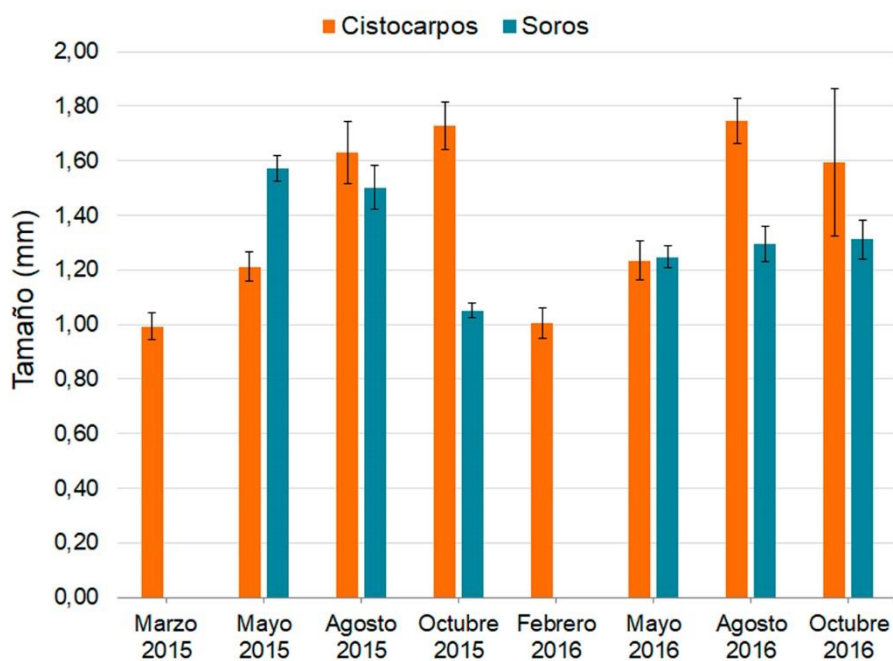


Fig. 3.7. Diámetro de los cistocarpos y ancho de los soros tetrasporangiales en las diferentes estaciones del año. Los valores representan la media \pm error estándar.

Tabla 3.3. Diámetro de los cistocarpos y ancho de los soros tetrasporangiales en las diferentes estaciones del año. Los valores representan la media \pm error estándar.

Fecha	Cistocarpos (mm)	Soros tetrasporangiales (mm)
Marzo 2015	0,99 \pm 0,05	
Mayo 2015	1,21 \pm 0,06	1,57 \pm 0,05
Agosto 2015	1,63 \pm 0,11	1,50 \pm 0,08
Octubre 2015	1,73 \pm 0,09	1,05 \pm 0,03
Febrero 2016	1,00 \pm 0,05	
Mayo 2016	1,23 \pm 0,07	1,25 \pm 0,04
Agosto 2016	1,74 \pm 0,08	1,29 \pm 0,06
Octubre 2016	1,59 \pm 0,27	1,31 \pm 0,07

3.2.3. Liberación de carpósporas y tetrásporas

Tanto carpósporas como tetrásporas se liberaron durante invierno y primavera, siendo la liberación en verano nula y en otoño muy baja (Fig. 3.8; Tabla 3.4).

La cantidad de tetrásporas liberadas por soro resultó mayor en invierno que en primavera para los dos años evaluados ($p_{2015} = 0,019$; $p_{2016} < 0,01$) (Fig. 3.6.a). La cantidad de carpósporas liberadas por cistocarpo también fue mayor en invierno que en primavera para 2015 ($p = 0,03$), aunque en 2016 no se observaron diferencias significativas entre estaciones ($p = 0,51$) (Fig. 3.8.a).

Teniendo en cuenta la cantidad de esporas liberadas por cm^2 de fronde, hubo diferencias significativas en cuanto a la liberación en invierno y primavera para ambos tipos de esporas, siendo ésta mucho mayor en invierno ($p < 0,01$ en todos los casos) (Fig. 3.8.b).

A su vez, la cantidad de carpósporas liberadas por cm^2 de fronde fue menor que la de tetrásporas en todas las estaciones ($p < 0,01$ en todos los casos), excepto en primavera de 2016 donde no hubo diferencias significativas ($p = 0,32$) (Fig. 3.8.b).

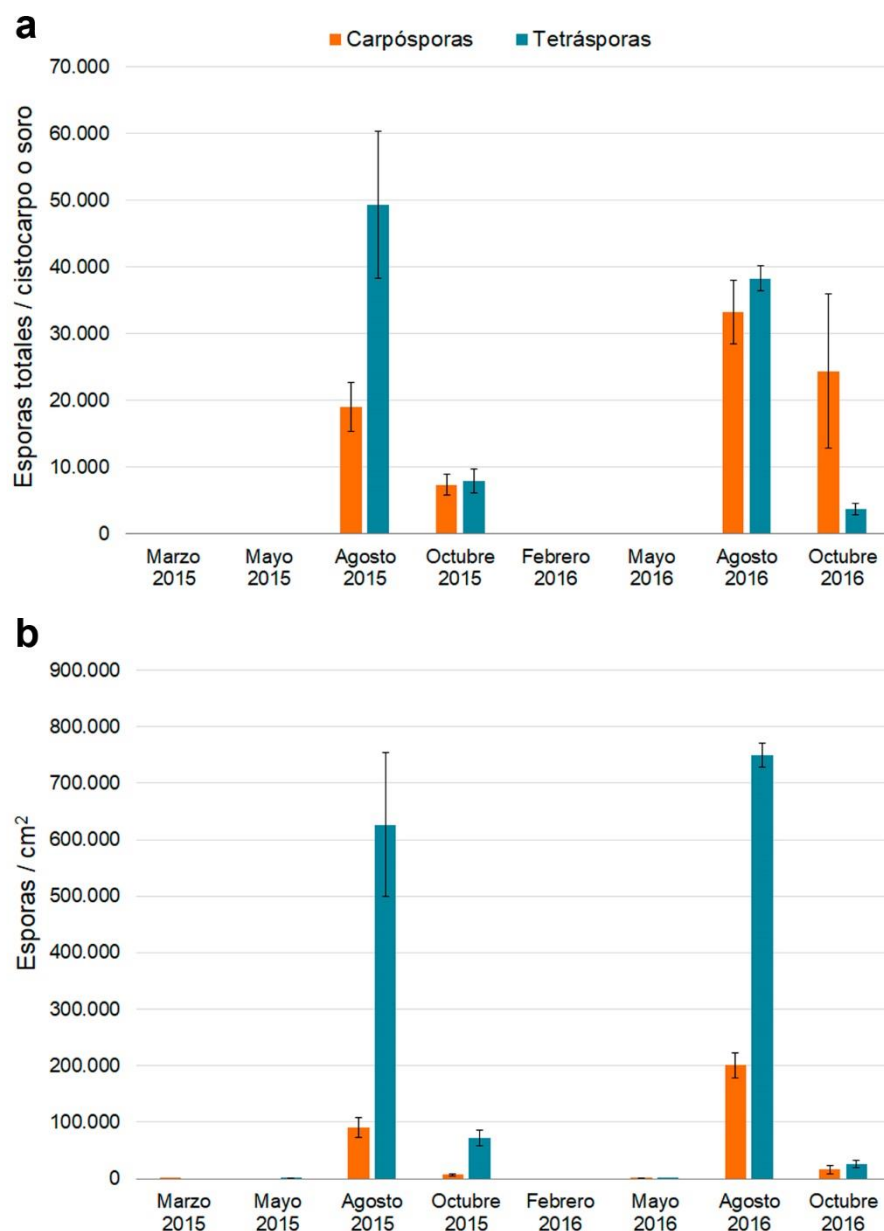


Fig. 3.8. Liberación estacional de carpósporas y tetrásporas. **(a)** Esporas totales liberadas por cistocarpo o soro durante una semana. **(b)** Esporas totales liberadas por cm² de fronde durante una semana. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.4. Esporas totales liberadas durante una semana por estructura reproductiva o por área de fronde, en las diferentes estaciones del año. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Fecha	Carpósporas		Tetrásporas	
	por cistocarpio	por cm^2	por soro	por cm^2
Marzo 2015	0,1 \pm 0,1	0,94 \pm 0,38		
Mayo 2015	0	0	40,3 \pm 17,8	512,9 \pm 226,4
Agosto 2015	18.952,9 \pm 3.676,3	90.353,8 \pm 17.556,9	49.364,1 \pm 11.006,6	626.170,4 \pm 127.209,1
Octubre 2015	7.336,8 \pm 1.564,1	6.920,2 \pm 1.904,9	7.933,8 \pm 1.743,5	72.293,7 \pm 14.379,7
Febrero 2016	0	0		
Mayo 2016	64,4 \pm 27,6	615,4 \pm 269,4	1,5 \pm 0,4	21,9 \pm 3,3
Agosto 2016	33.214,7 \pm 4811,3	200.600,1 \pm 22590,3	38.293,7 \pm 1865,5	749.199,9 \pm 21474,6
Octubre 2016	24.389,7 \pm 11532,8	15.905,7 \pm 7181,4	3.766,4 \pm 853,11	25.963,5 \pm 6283,2

El patrón de liberación de carpósporas fue distinto al de tetrásporas, siendo la liberación de las primeras más prolongada en el tiempo. Entre el 47 y el 79% de las carpósporas totales se liberaron durante los primeros dos días, mientras que más del 90% del total de tetrásporas se liberaron durante el mismo período (Fig. 3.9; Tablas 3.2 y 3.3).

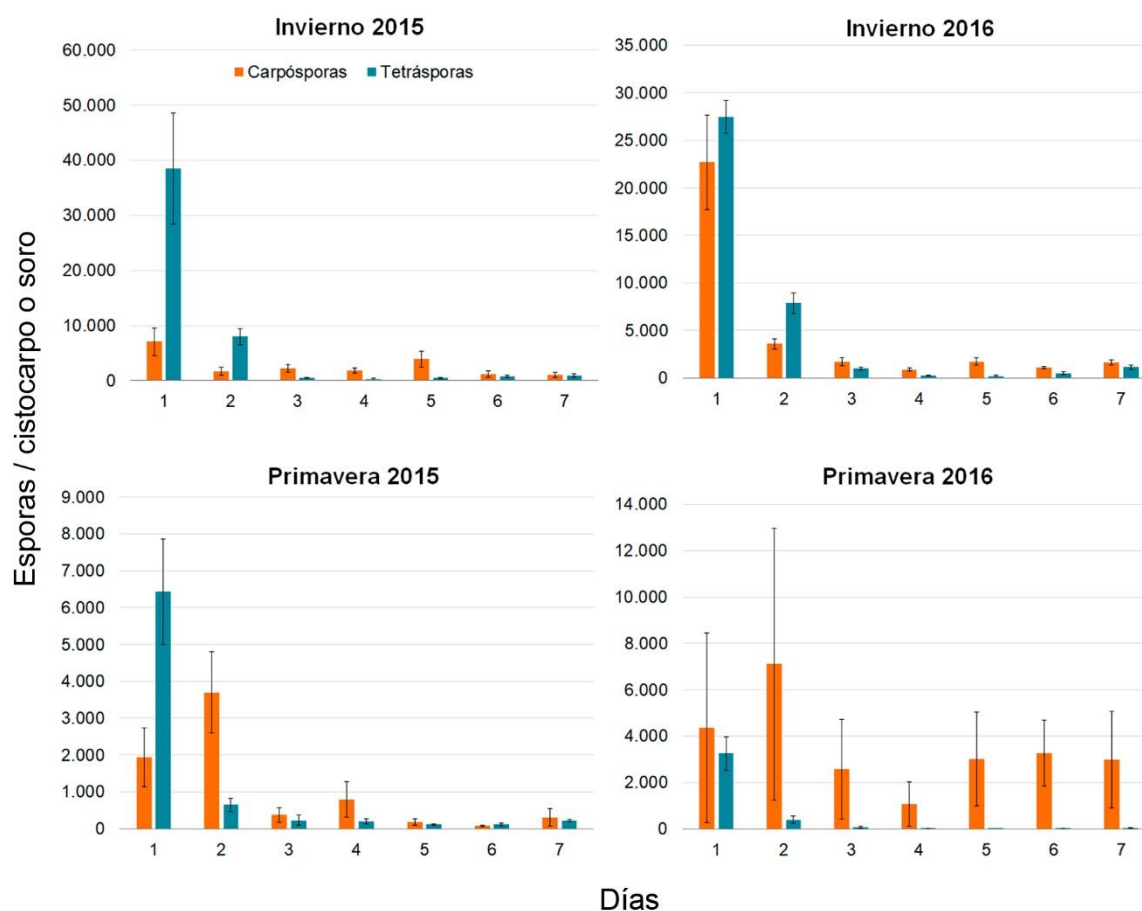


Fig. 3.9. Liberación diaria de carpósporas y tetrásporas durante una semana en invierno y primavera de 2015 y 2016. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.5. Porcentaje acumulado de carpósporas liberadas durante los sucesivos días del ensayo según la estación del año, tomando como 100% el total de carpósporas liberadas a los siete días.

Día	2015		2016	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
1	37,4	26,4	68,4	17,9
2	46,5	76,7	79,1	47,1
3	58,3	81,7	84,2	57,6
4	67,9	92,4	86,8	62,0
5	88,5	94,9	92,0	74,4
6	94,6	95,9	95,2	87,8
7	100	100	100	100

Tabla 3.6. Porcentaje acumulado de tetrásporas liberadas durante los sucesivos días del ensayo según la estación del año, tomando como 100% el total de tetrásporas liberadas a los siete días.

Día	2015		2016	
	Invierno	Primavera	Invierno	Primavera
1	78,0	81,1	71,7	86,4
2	94,1	89,2	92,2	96,6
3	95,1	92,0	94,7	98,4
4	95,7	94,4	95,3	98,7
5	96,6	95,8	95,8	98,7
6	98,1	97,2	97,0	99,2
7	100	100	100	100

En todas las fechas las carpósporas liberadas presentaron mayor diámetro que las tetrásporas, con una media de $24,05 \pm 0,5 \mu\text{m}$ y $21,23 \pm 0,5 \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 3.10).

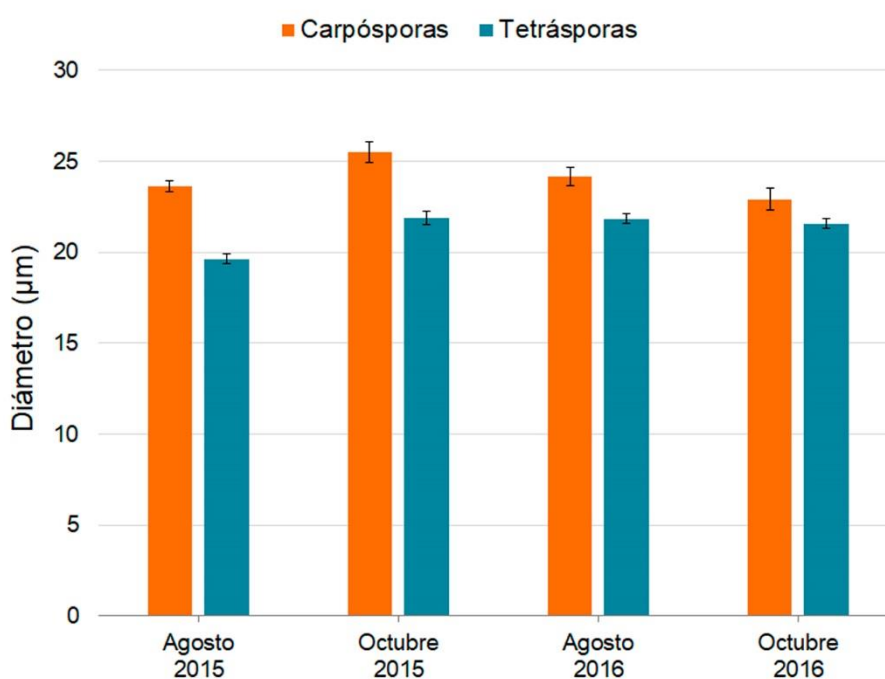


Fig. 3.10. Diámetro de carpósporas y tetrásporas liberadas durante invierno y primavera en dos años consecutivos. Los valores representan la media \pm error estándar

3.3. LIBERACIÓN DE ESPORAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES

3.3.1. Métodos de inducción

No se observaron diferencias significativas en la cantidad total de carpósporas o tetrásporas liberadas en una semana entre los tres métodos de inducción empleados ($p = 0,133$) (Fig. 3.11; Tabla 3.7). Sí se observó una diferencia entre la cantidad de carpósporas y tetrásporas liberadas ($p < 0,01$), siendo mayor la cantidad de tetrásporas.

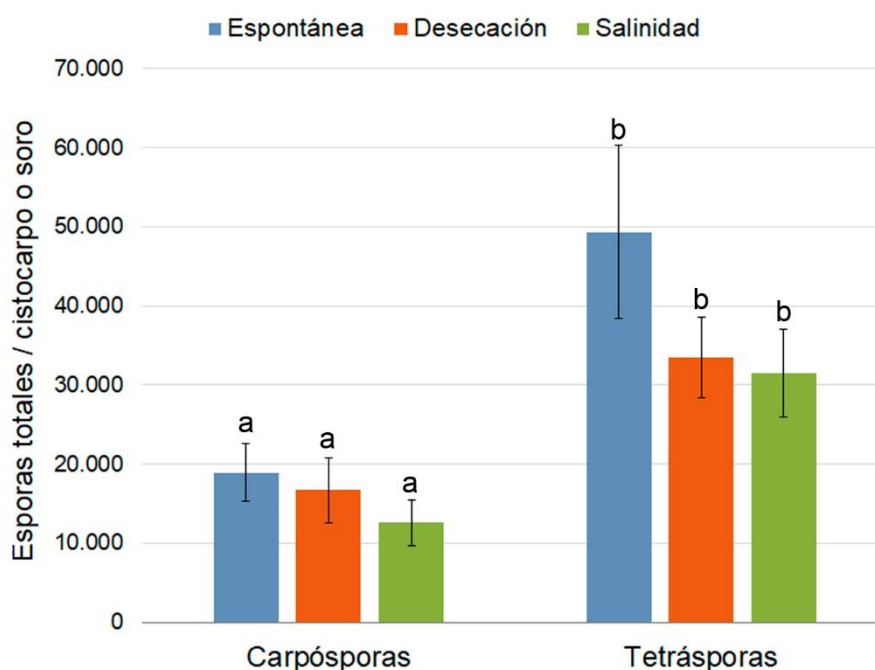


Fig. 3.11. Carpósporas y tetrásporas totales liberadas en una semana con diferentes métodos de inducción. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.7. Esporas totales liberadas por estructura reproductiva durante una semana, aplicando diferentes métodos de inducción a las frondes. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Método de inducción	Carpósporas	Tetrásporas
Esponánea	18.952,9 \pm 3.676,3	49.364,1 \pm 11.006,6
Desecación	16.702,6 \pm 4.109,5	33.456,5 \pm 5.097,3
Salinidad	12.588,9 \pm 2.858,4	31.539,6 \pm 5.562,1

El patrón de liberación mostró una liberación más prolongada en el tiempo de carpósporas, mientras que la mayoría de las tetrásporas se liberaron durante los primeros dos días, siendo la liberación muy baja en los días restantes (Fig. 3.12). A su vez, no se observaron diferencias en el patrón de germinación entre los diferentes métodos de inducción utilizados.

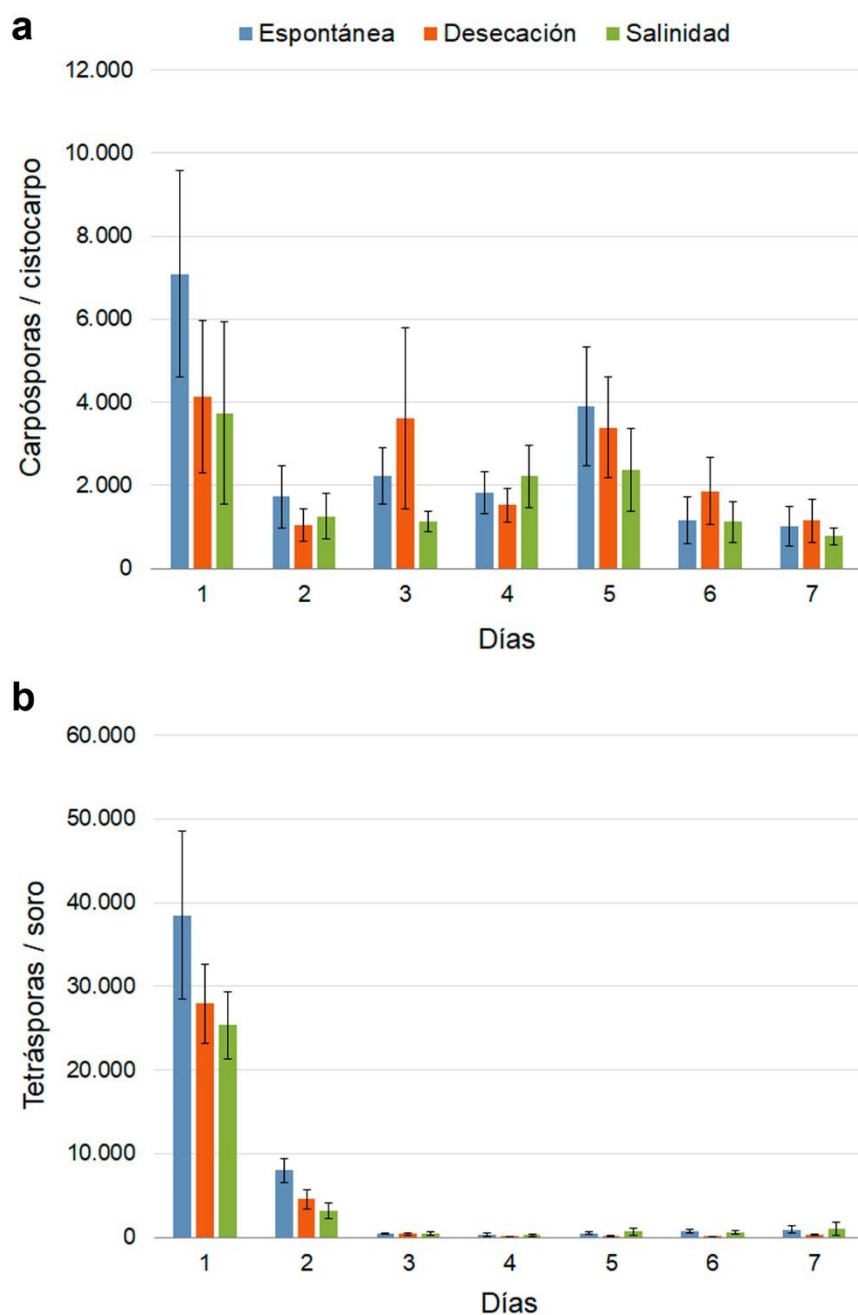


Fig. 3.12. Liberación diaria de esporas con diferentes métodos de inducción. **(a)** Carpósporas. **(b)** Tetrásporas. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

3.3.2. Temperatura

No hubo diferencias significativas en la cantidad de esporas liberadas en una semana entre las tres temperaturas evaluadas ($p = 0,335$), ni entre los tipos de fronde ($p = 0,344$) (Fig. 3.13; Tabla 3.8).

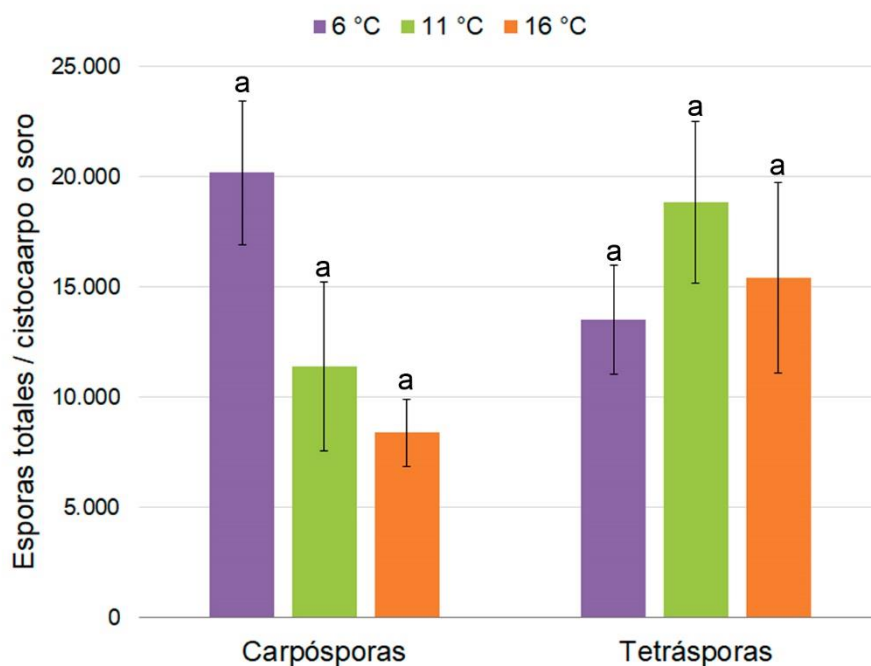


Fig. 3.13. Carpósporas y tetrásporas totales liberadas en una semana, a partir de talos incubados bajo distintas temperaturas. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.8. Esporas totales liberadas por estructura reproductiva durante una semana, a partir de frondes incubados bajo distintas temperaturas. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Temperatura (°C)	Carpósporas	Tetrásporas
6	20.169,4 \pm 3.272,4	13.509,3 \pm 2.484,6
11	11.392,3 \pm 3.822,2	18.847,5 \pm 3.673,2
16	8.379,6 \pm 1.505,5	15.417,4 \pm 4.316,4

El patrón de liberación no mostró diferencias entre las distintas temperaturas evaluadas (Fig. 3.14). Sin embargo, para las carpósporas se observó una tendencia a una menor liberación con el aumento de la temperatura (Fig. 3.14.a).

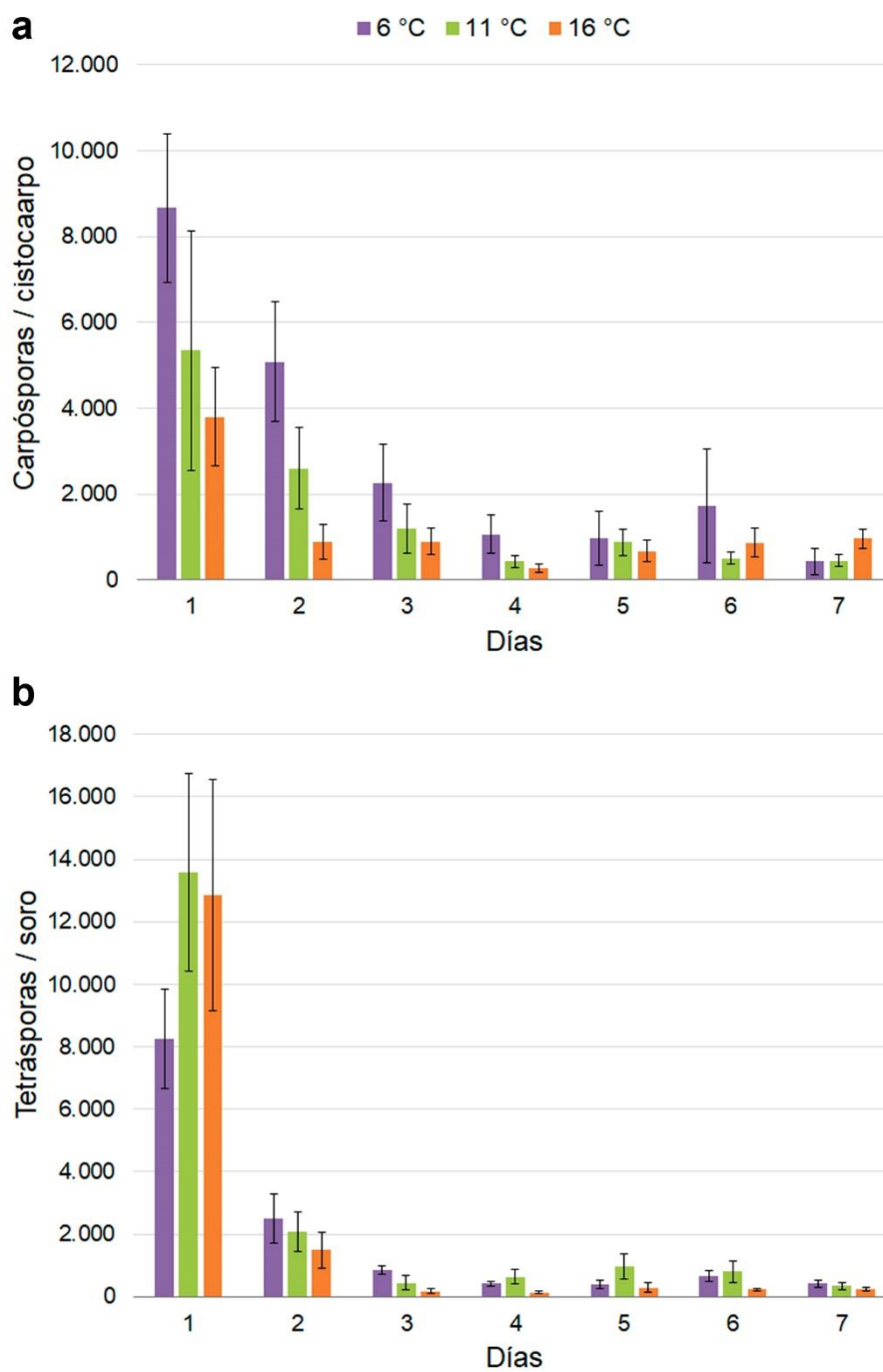


Fig. 3.14. Liberación diaria de esporas, a partir de talos incubados bajo distintas temperaturas. **(a)** Carpósporas. **(b)** Tetrásporas. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

3.3.3. Fotoperiodo

La cantidad de carpósporas liberadas no mostró diferencias significativas entre los fotoperiodos evaluados ($p = 0,233$) (Fig. 3.15.a).

En cuanto a la liberación de tetrásporas, cabe recordar que el ensayo se realizó en dos partes. Durante el primer año, la liberación fue menor con fotoperiodo corto (8:16 (L:O)) que neutro (12:12 (L:O)) ($p = 0,028$) (Fig. 3.15.b), mientras que, en el segundo año, no hubo diferencias significativas en la liberación de tetrásporas entre fotoperiodos largo (16:8 (L:O)) y neutro ($p = 0,099$) (Fig. 3.15.c).

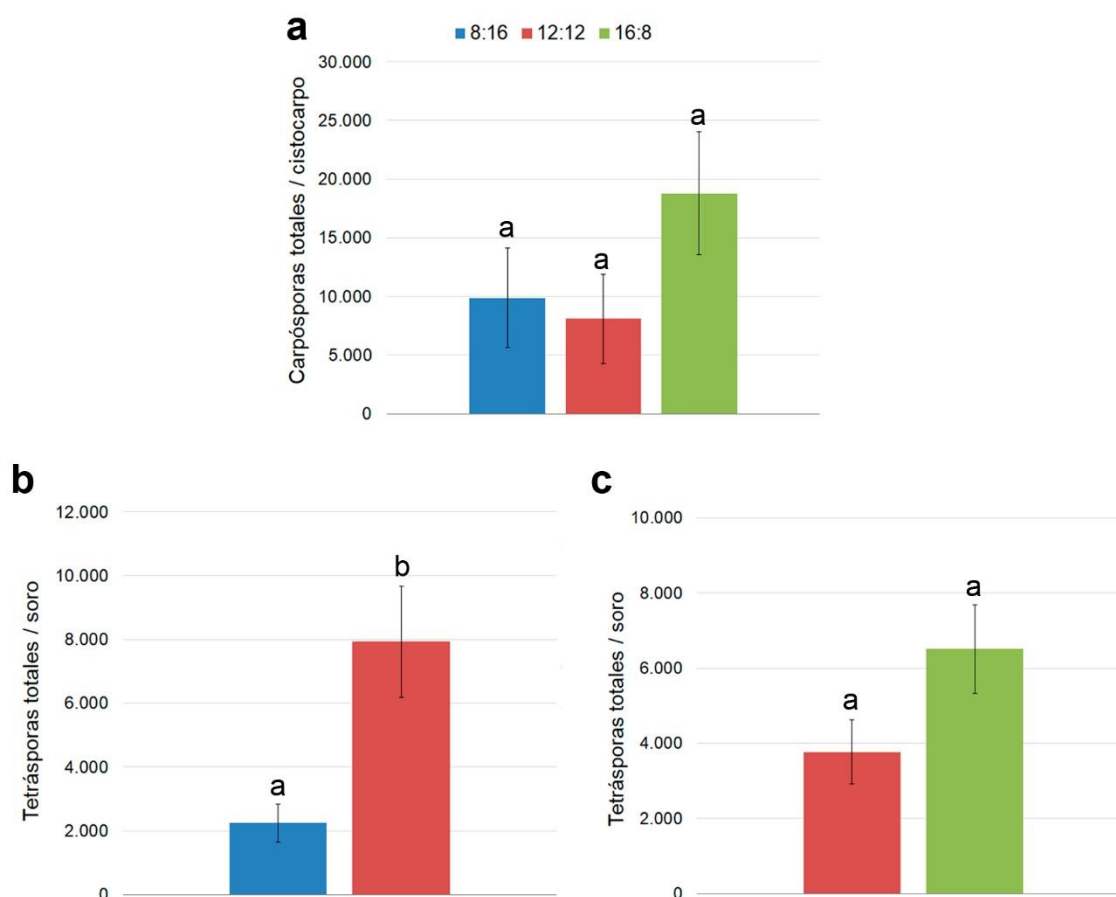


Fig. 3.15. Esporas totales liberadas en una semana, a partir de talos incubados bajo distintos fotoperiodos. **(a)** Carpósporas liberadas bajo los tres fotoperiodos. **(b)** Tetrásporas liberadas con fotoperiodos corto y neutro durante 2016. **(c)** Tetrásporas liberadas con fotoperiodos largo y neutro durante 2017. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.9. Esporas totales liberadas por estructura reproductiva durante una semana, a partir de frondes incubados bajo distintos fotoperiodos. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Fotoperiodo (L:O)	Carpósporas	Tetrásporas	
		1er año	2do año
8:16	9.859,8 \pm 4.236,8	2.245,4 \pm 593,1	
12:12	8.103,6 \pm 3.801,4	7.933,8 \pm 1743,5	3.766,4 \pm 853,1
16:8	18.788,1 \pm 5.236		6.508,6 \pm 1172,8

En cuanto al patrón de liberación, en las carpósporas se observó que, tanto con fotoperiodo largo como corto, hubo un pico de liberación durante los primeros días, mientras que la liberación fue más prolongada en el tiempo con fotoperiodo neutro (Fig. 3.16).

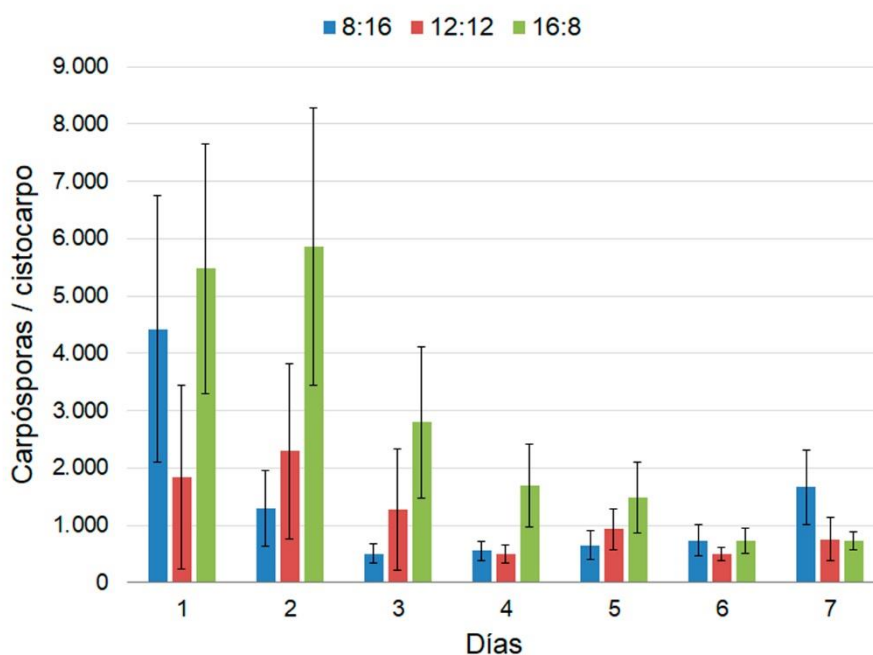


Fig. 3.16. Liberación diaria de carpósporas a partir de talos incubados bajo distintos fotoperiodos. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

El patrón de liberación de tetrásporas no mostró diferencias entre los fotoperiodos empleados, ocurriendo la mayor liberación en el primer día (Fig. 3.17.a, b). Se observó una tendencia a una mayor liberación con el aumento de horas de luz (Fig. 3.17.a, b).

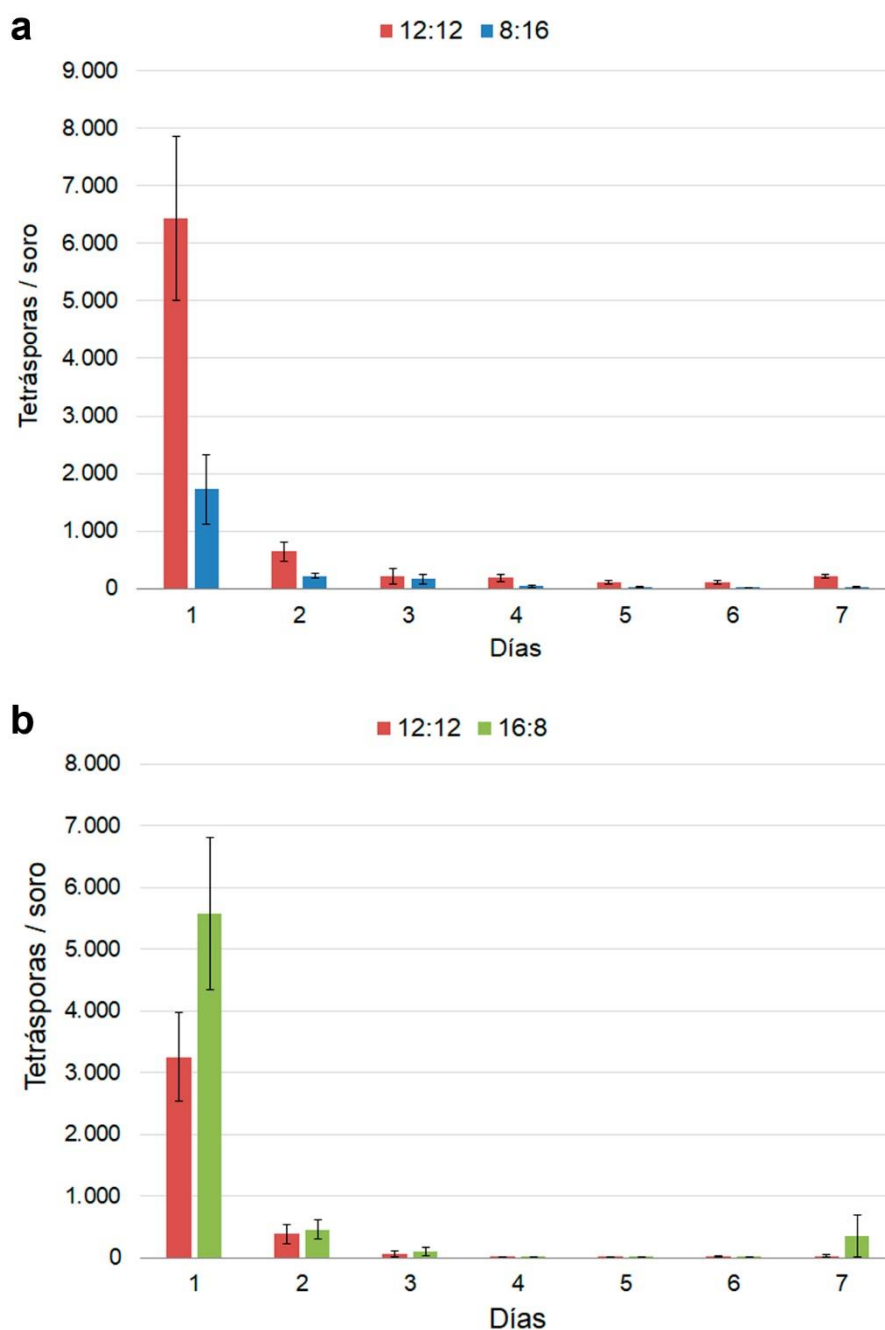


Fig. 3.17. Liberación diaria de tetrásporas a partir de talos incubados bajo distintos fotoperiodos. **(a)** Fotoperiodo corto y neutro. **(b)** Fotoperiodo largo y neutro. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

3.4. PROCESO DE GERMINACIÓN DE ESPORAS

El patrón de germinación de las esporas de *G. skottsbergii* fue del tipo Dumontia. En la figura 3.18 se muestra la germinación de tetrásporas.

Las tetrásporas ($21,23 \pm 0,5 \mu\text{m}$) (Fig. 3.18.a) comenzaron a dividirse inmediatamente luego de la liberación. La primera división ocurrió perpendicular al sustrato, originando un estadio bicelular durante la primera semana (Fig. 3.18.b). La segunda división ocurrió perpendicular a la primera, originando un estadio de tres células (Fig. 3.18.c) y luego uno tetracelular, durante la segunda semana (Fig. 3.18.d). Entre la segunda y tercera semanas, se observaron estadios multicelulares (Fig. 3.18.e). Hacia la sexta semana, sucesivas divisiones dieron lugar a un estadio hemisférico de $117 \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. 3.18.f). A los cuatro meses y medio los gametofitos tempranos fueron observables a simple vista, alcanzando una longitud de alrededor de 1 mm y diferenciándose una porción basal de fijación y una porción apical laminar (Fig. 3.18.g, h, i).

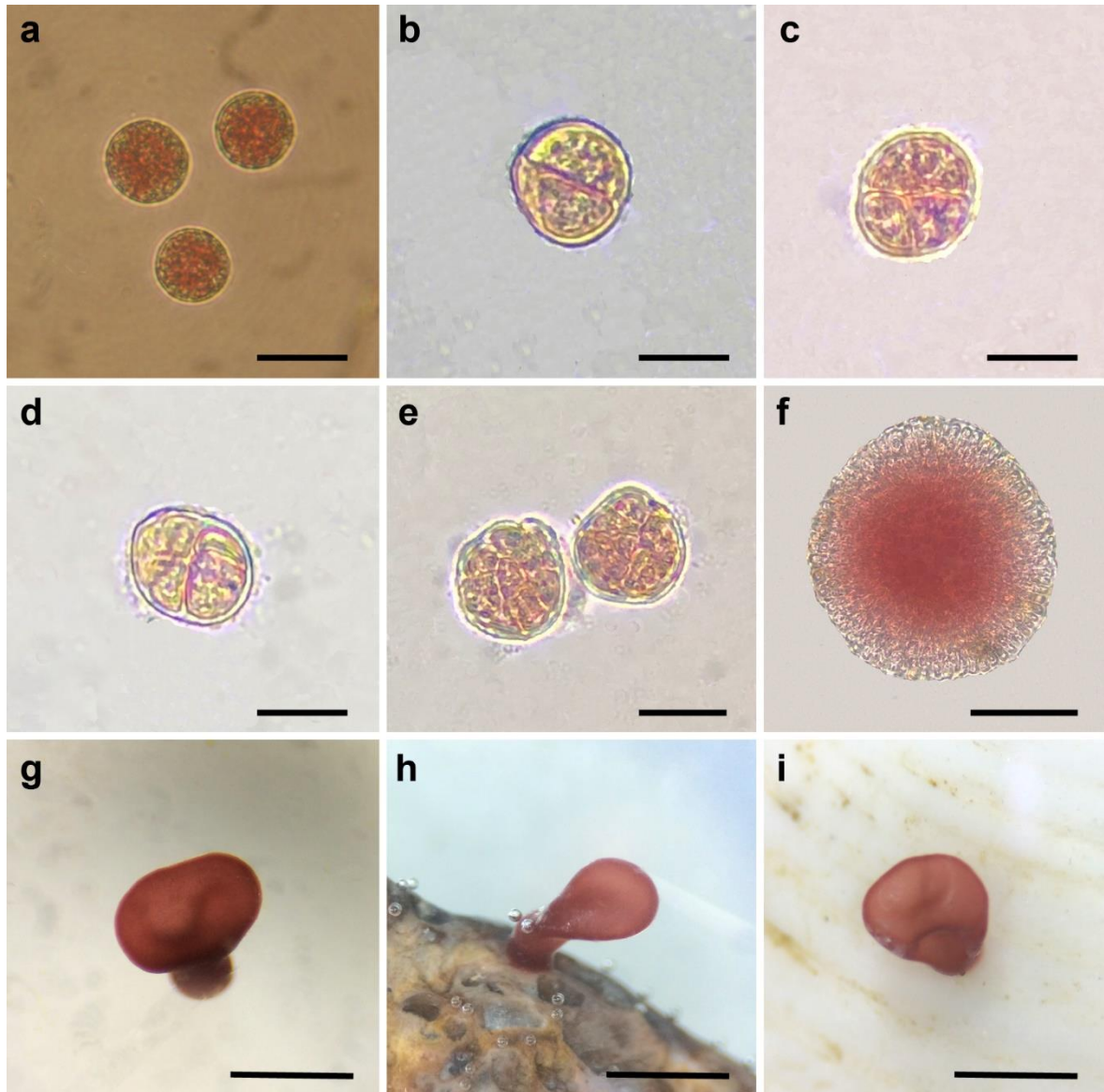


Fig. 3.18. Proceso de germinación de tetrásporas de *G. skottsbergii*. **(a)** Esporas liberadas. **(b)** Estadio bicelular. **(c)** Estadio tricelular. **(d)** Estadio tetracelular. **(e, f)** Estadios multicelulares. Desarrollo de gametofitos tempranos sobre **(g)** vidrio, **(h)** piedras, **(i)** conchillas. Barras escala: a-e = 25 μ m; f = 50 μ m; g-i = 1 mm.

3.5. EXPERIENCIAS DE ESPOROCULTIVO SOBRE DISTINTOS SUSTRATOS

La mayor densidad inicial de carpósporas se registró sobre vidrio y la menor sobre piedras ($p = 0,026$), mientras que sobre ambos tipos de conchillas se observaron densidades intermedias (Fig. 3.19.a; Tabla 3.10).

En cuanto a tetrásporas, se observaron las mayores densidades sobre vidrio, siendo éstas significativamente distintas que en los demás sustratos ($p < 0.01$) (Fig. 3.19.b; Tabla 3.11).

Hubo una gran mortalidad de esporas durante las dos primeras semanas de cultivo, obteniéndose una supervivencia de entre 0% y 15,5% para carpósporas sobre piedras y mejillones, respectivamente, y de entre 1% y 2,3% para tetrásporas sobre vidrio y mejillones, respectivamente (Tabla 3.12).

Las densidades de esporas en la segunda semana fueron muy bajas, no habiendo diferencias entre sustratos para carpósporas ($p = 0.27$) o tetrásporas ($p = 0,72$), con un promedio de 5 carpósporas / cm^2 y de 14 tetrásporas / cm^2 .

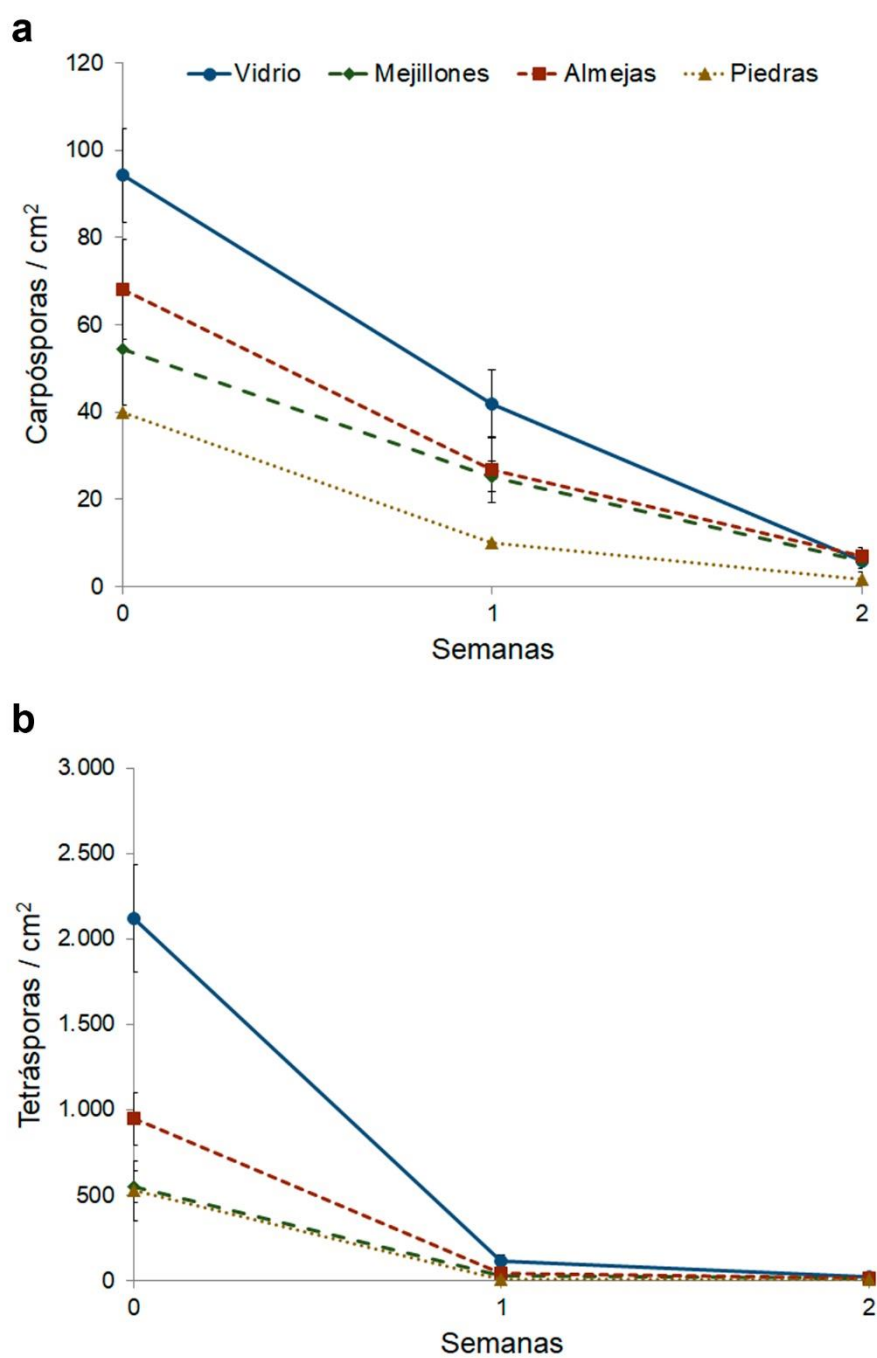


Fig. 3.19. Densidad de **(a)** carpósporas y **(b)** tetrásporas de *G. skottsbergii* sobre distintos sustratos. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Tabla 3.10. Densidades de carpósporas de *G. skottsbergii* cultivadas *in vitro* sobre diferentes sustratos. Los datos representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Semanas	Vidrio	Mejillones	Almejas	Piedras
0	94,3 \pm 10,7	54,6 \pm 13	68,1 \pm 11,5	39,9 \pm 0,1
1	42 \pm 7,7	25,2 \pm 3,4	26,7 \pm 7,4	10 \pm 0,01
2	6 \pm 1	6 \pm 1,9	7 \pm 2	1,7 \pm 1,7

Tabla 3.11. Densidades de tetrásporas de *G. skottsbergii* cultivadas *in vitro* sobre diferentes sustratos. Los datos representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

Semanas	Vidrio	Mejillones	Almejas	Piedras
0	2.119,6 \pm 312,6	549,5 \pm 92,3	947,2 \pm 151,8	525,6 \pm 174,2
1	116,5 \pm 33,7	28,6 \pm 0,8	45,2 \pm 13,7	5 \pm 5
2	18,9 \pm 3,7	12 \pm 5,2	15 \pm 6,7	10 \pm 7,1

Tabla 3.12. Supervivencia (%) de esporas sobre distintos sustratos luego de dos semanas en cultivo *in vitro*. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 5$.

	Vidrio	Mejillones	Almejas	Piedras
Carpósporas	7,43 \pm 2,58	15,48 \pm 7,76	11,72 \pm 4,65	0
Tetrásporas	0,95 \pm 0,25	2,30 \pm 1,18	1,45 \pm 0,61	1,74 \pm 1,08

4. DISCUSIÓN

La disponibilidad de esporas de *G. skottsbergii* colectada en una población localizada en Punta Pescadero (Cabo Raso, Chubut) resultó limitada, pudiendo obtenerse tanto carpósporas como tetrásporas únicamente en invierno y primavera. No se logró obtener esporas en verano y, en otoño, la liberación fue muy baja, no siendo suficiente para iniciar cultivos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en una población de la misma especie situada en Ancud, Chile, para la cual la mayor liberación de esporas ocurrió en los meses de invierno y primavera temprana (Avila et al. 1999b; Buschmann et al. 1999), mientras que desde primavera tardía a inicios de otoño la liberación de esporas fue muy

baja (Buschmann et al. 1999). La limitada disponibilidad de esporas en el año para esta especie también había sido observada por otros autores (Correa et al. 1999).

La densidad de cistocarpos registrada sobre los gametofitos femeninos fue mayor durante verano y otoño, disminuyendo hacia invierno y siendo mínima en primavera, lo que coincide con lo observado en *G. skottsbergii* proveniente de Chile (Avila et al. 1997, 1999b). A pesar de que hubo una mayor densidad de cistocarpos en verano y otoño, el tamaño de los cistocarpos durante estos meses fue menor que durante invierno y primavera, posiblemente indicando que la alta densidad de cistocarpos registradas durante las dos primeras estaciones corresponde a estructuras inmaduras. De esta manera, a medida que comienza la liberación de esporas a principios de invierno, disminuiría la densidad de cistocarpos sobre el gametofito femenino. A lo largo del año, se observó una densidad relativamente constante de cicatrices sobre talos cistocárpicos. Las mismas serían el resultado de la liberación de las carpósporas y posterior necrosis y desprendimiento de las papilas, formando heridas que luego cicatrizan dejando marcas en la superficie de la fronde (Piriz 1996; Avila et al. 1999b).

Por su parte, si bien el tamaño de los soros tetrasporangiales no mostró un patrón definido a lo largo del año, la madurez de los mismos pudo determinarse por su color. De esta manera, se observó para ambos años un pico en la densidad de soros maduros durante los meses de invierno, seguido en los meses de primavera por un pico en la densidad de soros vacíos. Esto indicaría que la liberación de tetrásporas ocurre principalmente durante invierno, coincidiendo con las experiencias de liberación realizadas. Resultados similares se obtuvieron en la población de *G. skottsbergii* de la costa chilena mencionada, con una mayor densidad de soros maduros en otoño-invierno y de soros vacíos a finales de invierno-principios de primavera (Avila et al. 1997, 1999b). A su vez, en el presente estudio la densidad de soros inmaduros fue mayor en los meses de otoño para ambos años, época en la que no se obtuvo liberación de esporas, indicando que los soros están aún en formación en esta época del año.

En este estudio se encontraron frondes cistocárpicas de *Gigartina skottsbergii* en las cuatro estaciones de los dos años evaluados, mientras que no se hallaron frondes tetraspóricas con soros en los meses de verano. En el único estudio de fenología de *G. skottsbergii* en Argentina, realizado en una población ubicada en Punta Thompson (Chubut), se registró una mayor cantidad de ejemplares cistocárpicos durante otoño, coincidiendo con la mayor fertilidad de las frondes (calculada como la proporción de ejemplares con más del 75% de la superficie cubierta por papilas fértiles) (Piriz 1996). Los datos obtenidos en el presente estudio complementan a los registrados por Piriz (1996), ya que se determinó la densidad de cistocarpos sobre las frondes femeninas, y el tamaño de

los mismos, así como también la liberación de esporas a lo largo del año. De esta manera, a pesar que Piriz (1996) registró una mayor densidad de papilas fértiles durante otoño, los cistocarpos no estarían maduros durante esta época, por lo que la liberación de esporas no ocurre sino hasta los meses de invierno. Por su parte Piriz (1996) no encontró una estacionalidad en la proporción de tetrasporofitos, siendo su abundancia constante pero baja durante el año, algo que también fue observado en *G. skottsbergii* de la costa chilena (Zamorano y Westermeier 1996).

En cuanto a la periodicidad de liberación de esporas durante invierno y primavera, entre el cuarto y sexto día de liberación, se obtuvo el 90% de las carpósporas totales, mientras que, en el caso de las tetrásporas, ya en el segundo día se había alcanzado este porcentaje de esporas liberadas. Esto indicaría que la liberación de carpósporas es más lenta y prolongada que la de tetrásporas. De esta manera, para obtener un buen rendimiento del material fértil, habría que mantener los talos cistocárpicos más días que los tetraspóricos para lograr un alto porcentaje de liberación de esporas. Esto implicaría un mayor riesgo de contaminación con epífitos que suelen estar presentes en las frondes fértiles, lo que constituye un problema importante en cultivos de algas (Buschmann et al. 2001b; Leonardi et al. 2006; Vairappan et al. 2007). A pesar de que *G. skottsbergii* es una especie que generalmente presenta un buen estado de sanidad (Buschmann et al. 2001a), sería imprescindible mejorar los protocolos de limpieza de las frondes, principalmente las cistocárpicas, para asegurar un mayor rendimiento de los cultivos.

En general, la cantidad de esporas liberadas por área de fronde fue mucho mayor para tetrasporofitos que para frondes cistocárpicas. Por lo tanto, para obtener una adecuada cantidad de esporas para iniciar cultivos específicos de gametofitos o tetrasporofitos, se requerirá menor biomasa tetraspórica que cistocárpica, respectivamente. Esto resulta relevante teniendo en cuenta que, en el ambiente natural, generalmente hay una dominancia de los gametofitos sobre los tetrasporofitos (Piriz et al. 1996; Zamorano y Westermeier 1996). La posibilidad de realizar cultivos específicos para obtener biomasa gametofítica y tetrasporofítica por separado resulta de suma importancia ya que, como se mencionó anteriormente, los gametofitos de esta especie producen carragenanos del tipo Kappa/Iota-, mientras que los tetrasporofitos producen carragenanos del tipo Lambda-, los cuales tienen diferentes propiedades y utilidades (Usov 2011).

En este estudio no se logró obtener una mayor cantidad de esporas mediante la aplicación de los tratamientos de desecación o shock osmótico (alta salinidad), por lo que la liberación espontánea sería el método más recomendable para obtener tanto carpósporas como tetrásporas, por ser ésta menos costosa y laboriosa. A pesar de que los métodos de inducción, principalmente el de desecación de las frondes, son comúnmente

utilizados para inducir la liberación de esporas en diversas especies de carragenófitas (Infante y Candia 1988; Avila et al. 1999a, 2011; Romo et al 2001; Mansilla et al. 2008; Bulboa et al. 2010), así como en otras algas rojas (Avila et al 2014), este método no siempre resulta en una mayor cantidad de esporas liberadas (Prataprao Shere 1985, Michetti et al. 2013). Por otra parte, en el alga carragenófito *Kappaphycus alvarezii*, se observó que ocurría una mayor liberación de carpósporas cuando las frondes eran expuestas a una salinidad similar a la del ambiente (Azanza y Alianza 1999), lo que estaría de acuerdo con los resultados del presente trabajo.

No se encontraron diferencias en la liberación de carpósporas o tetrásporas bajo las tres temperaturas utilizadas. Por otro lado, a pesar de que no hubo diferencias en la liberación de carpósporas bajo los tres fotoperiodos evaluados, la liberación de tetrásporas resultó mayor con el aumento de las horas de luz. Esto indicaría un posible efecto positivo de la cantidad de horas de luz en la apertura de los soros para la liberación de tetrásporas. Resulta interesante destacar que, la mayor liberación de esporas ocurre a partir de los meses de invierno, cuando el fotoperiodo en el ambiente natural comienza a alargarse. En este sentido, se ha visto que tanto el fotoperiodo como la temperatura están correlacionados con la variación en biomasa de frondes cistocárpicas, aunque esta correlación no se encontró para frondes tetráspóricas (Zamorano y Westermeier 1996).

En este estudio se evaluó el asentamiento de carpósporas y tetrásporas sobre tres sustratos naturales (conchillas de mejillones y almejas, y piedras) y uno artificial (vidrio). Si bien las mayores densidades iniciales se observaron sobre vidrio para ambos tipos de esporas, no hubo diferencias entre sustratos luego de dos semanas de cultivo. En todos los sustratos evaluados se obtuvieron supervivencias muy bajas, con entre 0 y 15,5% de supervivencia para carpósporas, y entre 1 y 2,3% de supervivencia para tetrásporas, a pesar de que los ensayos se realizaron en invierno, época del año indicada como la de mayor germinación de esporas (Buschamnn et al. 1999). La alta mortalidad observada en este estudio para esporas de *G. skottsbergii* había sido señalada previamente por Avila (1999b) en poblaciones chilenas, quienes obtuvieron una mortalidad a los cinco días de cultivo *in vitro* de 79-88% para tetrásporas y de 87-92% para carpósporas. Por su parte, Buschmann et al. (1999) logró obtener una supervivencia de entre el 68 y 85% en frondes juveniles luego de un mes de ser trasplantadas a tanques exteriores. Ello podría indicar que las mayores tasas de mortalidad ocurren durante las primeras etapas de desarrollo (Santelices 1990) y, una vez alcanzados los estadios juveniles, la mortalidad disminuye.

Otros autores han obtenido resultados más promisorios en esporocultivos de *G. skottsbergii*. Mansilla et al. (2008) cultivaron exitosamente gametofitos de esta especie a partir de esporas, con un 100% de supervivencia con medio de cultivo Provasoli y el

fertilizante comercial Bayfolan, a los dos meses de cultivo *in vitro*. Por otra parte, Marambio et al. (2014) lograron obtener en laboratorio tetrasporofitos y gametofitos a partir de carpósporas y tetrásporas en condiciones de temperatura y fotoperiodo similares a las utilizadas en el presente estudio, aunque utilizando baja intensidad lumínica (entre 2 y 8 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Es interesante destacar que, en los mencionados trabajos, las frondes fértiles se colectaron en una localidad del sur de Chile, a latitudes más elevadas que en el presente estudio y en el realizado por Avila et al. (1999b). La población muestreada en este estudio se encuentra al límite norte de distribución de la especie, por lo que existe la posibilidad de que los ejemplares de la misma estén sometidos a condiciones que no son óptimas para la especie (Faugeron et al. 2004). Por ello sería interesante realizar estudios con ejemplares recolectados en poblaciones localizadas a latitudes más altas en la costa Atlántica, en las provincias de Santa Cruz o Tierra del Fuego.

El presente estudio es el primero en el que se evalúa la disponibilidad de esporas a lo largo del año y la viabilidad del esporocultivo *in vitro* para *Gigartina skottsbergii* de la costa de Argentina. Se observó que ambos tipos de esporas se liberan en la misma época del año, lo que indicaría que, para completar el ciclo de vida de esta especie (Fig. 3.20), se requerirían al menos dos años. Además, para lograr una mayor supervivencia de las plántulas y facilitar su desarrollo, aún es necesaria la optimización de las condiciones de cultivo *in vitro*.

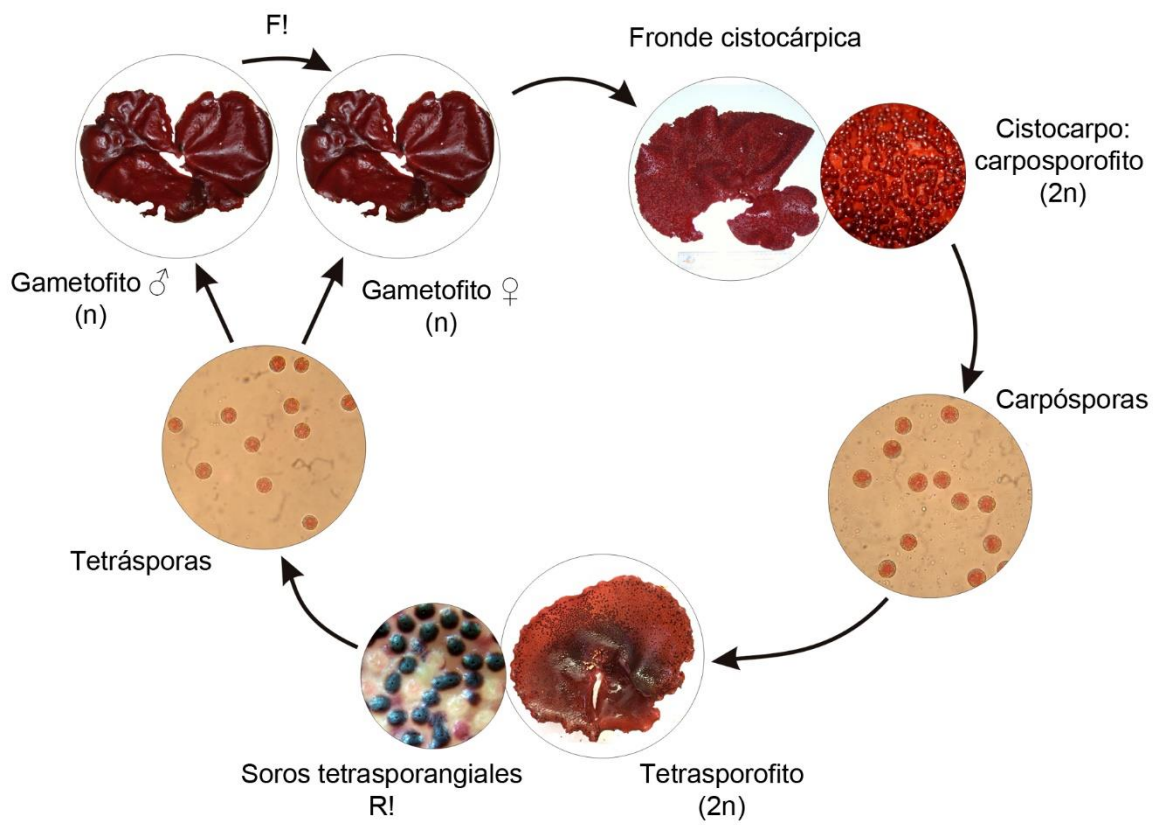


Fig. 3.20. Ciclo de vida de *G. skottsbergii*. F!: fecundación; R!: meiosis; n: haploide; 2n: diploide.

CAPÍTULO 4

Sarcothalia crispata:
liberación de esporas y germinación sobre
distintos sustratos

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Sarcothalia crispata*, previamente conocida como *Iridaea undulosa* Bory, *I. ciliata* Kützinger o *I. crispata* Bory (Scrosati 1991), tiene distribución austral (Hommersand et al. 1993), encontrándose en el submareal y ocasionalmente en el intermareal inferior, en piletas de marea. Se caracteriza por frondes laminares con el ápice normalmente afinado, que alcanzan los 50 cm de largo, desde color rojo hasta dorado, a veces iridiscente, con los márgenes de las frondes típicamente dentados o ciliados y los cistocarpos y soros tetrasporangiales protruyendo levemente del talo (Boraso de Zaixso et al. 2013). El talo posee un pequeño pie y se encuentra arraigado al sustrato a través de un disco de fijación. *S. crispata* es cosechada de praderas naturales en Chile y empleada en la industria de carragenanos. En Argentina, como se mencionó anteriormente, esta especie ha sido indicada como posible materia prima para la industria de carragenanos, aunque solo ha sido cosechada ocasionalmente (Boraso de Zaixso et al. 1998).

En la costa Atlántica de Sudamérica existen muy pocos trabajos realizados en esta especie. Entre ellos se destacan los primeros registros de la especie (Scrosati 1991), y los relativos a la estructura química de los carragenanos (Matulewicz y Cerezo 1980; Stortz y Cerezo 1993; Flores et al. 1997, 2000a, b).

En Chile, diversos aspectos de esta especie han sido investigados, entre los que se destacan los estudios de la dinámica estacional y fenología de poblaciones de *S. crispata* del sur del país (Avila et al. 1996; Otaíza et al. 2001), así como también el reclutamiento de carpósporas y tetrásporas (Avila et al. 1996). Se han realizado experiencias de cultivo de *S. crispata*, principalmente en canto rodado y sogas de polipropileno (Avila et al. 1996, 1999b; Romo et al. 2001). También se ha evaluado el efecto de distintos factores abióticos en el crecimiento de plántulas, como por ejemplo la radiación UVB (Mansilla et al. 2006) y la salinidad (Mansilla et al. 2004). A su vez, se ha estudiado el uso de fertilizantes para el cultivo de esta especie (Werlinger et al. 2008). En cultivos suspendidos se han cultivado exitosamente tetrásporas, obteniéndose frondes de 40 cm luego de nueve meses de crecimiento a campo (Romo et al. 2001). La numerosa información obtenida a través de estos estudios ha posibilitado incluso el desarrollo de manuales de cultivo de *S. crispata* en ciertas regiones de Chile (Candia y Núñez 2013, 2017; Otaíza y Cáceres 2015).

Por otro lado, con el objeto de iniciar esporocultivos, también es relevante la determinación de un método con el que se obtengan carpósporas y tetrásporas viables en gran cantidad para utilizar como inóculo de los sustratos adecuados. En este aspecto,

Infante y Candia (1988) ensayaron métodos de inducción para obtener carpósporas de *S. crispata*, pero no se han llevado a cabo estudios similares en tetrásporas.

Bajo este contexto, los **objetivos** del presente capítulo estuvieron focalizados en:

1. Determinar la disponibilidad de carpósporas y tetrásporas de *Sarcothalia crispata* de una población de Cabo Raso, Chubut, a partir de biomasa cistocárpica y tetraspórica, respectivamente.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de distintos métodos de inducción (desección, shock osmótico, temperatura) en la liberación de carpósporas y tetrásporas.
3. Evaluar la germinación de ambos tipos de esporas en laboratorio
4. Estudiar la potencialidad de distintos sustratos artificiales (vidrio, sogas) y naturales (conchillas, piedras) para el asentamiento de carpósporas y tetrásporas.
5. Estimar la supervivencia y el crecimiento de los tetrasporofitos y gametofitos resultantes de la germinación de esporas sobre los distintos sustratos artificiales y naturales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplares cistocárpicos y tetraspóricos maduros de *Sarcothalia crispata* se colectaron por buceo durante el invierno de 2017 a 1-5 metros por debajo del nivel medio de marea. La fase del ciclo de vida de cada ejemplar colectado se corroboró mediante el test de resorcinol. Las condiciones de cultivo fueron de 10 ± 1 °C, 12:12 (Luz:Oscuridad), 30 ± 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.1. DISPONIBILIDAD DE ESPORAS

2.1.1. Densidad y tamaño de estructuras reproductivas

Para cada fase del ciclo de vida se determinó la densidad de estructuras reproductivas, mediante el recuento del número de cistocarpos o soros tetrasporangiales presentes en cinco campos aleatorios de 50 mm² en cada fronde, a partir de micrografías tomadas en lupa binocular. En cada campo, se registró el número de cistocarpos y soros tetrasporangiales inmaduros, maduros y vacíos según la siguiente escala colorimétrica: marrón claro: inmaduros, marrón oscuro-negro: maduros, blanco: vacíos (Santelices y Martínez 1997; Avila et al. 1999b).

El tamaño de las estructuras reproductivas se midió en micrografías de secciones transversales de las frondes tomadas bajo lupa binocular.

2.1.2. Métodos de inducción de la liberación de esporas

Fragmentos circulares de 1 cm de diámetro de frondes cistocárpicas y tetraspóricas maduras se cortaron con sacabocado, se limpiaron con un cepillo de cerda y se enjuagaron con agua de mar estéril para remover detritos y epifitos. Los fragmentos de cada tipo de fronde se separaron aleatoriamente en cuatro grupos para la aplicación de los tratamientos.

Se evaluaron cuatro métodos para la estimulación de la liberación de esporas: 1) liberación espontánea (control); 2) desecación: los fragmentos de talo se dejaron secar parcialmente por una hora sobre papel absorbente en oscuridad; 3) shock osmótico: los fragmentos se colocaron por una hora en agua de mar con alta salinidad (60); 4) baja temperatura: los fragmentos se colocaron por una hora en agua de mar a 1-5 °C. Luego de aplicar los tratamientos, seis fragmentos con un número conocido de cistocarpos o soros tetrasporangiales se colocaron en una caja de Petri, con 10 mL de medio de cultivo PES, y se mantuvieron en las condiciones de cultivo mencionadas previamente. Se utilizaron cuatro réplicas por cada tipo de fronde y tratamiento (un total de 32 cajas de Petri). El medio de cultivo se retiró cada 24 h para el recuento de las esporas liberadas y se reemplazó con medio de cultivo nuevo. Este procedimiento se repitió durante cinco días.

Para cada réplica se contaron las esporas presentes en dos alícuotas de 1 mL de la suspensión de esporas.

2.2. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE ESPORAS

Para evaluar la germinación de esporas y el crecimiento de las plántulas resultantes se emplearon suspensiones de esporas (Fig. 4.1.a). Para preparar los inóculos de carpósporas y tetrásporas se cortaron fragmentos circulares de talos cistocárpicos y tetraspóricos maduros, respectivamente, los cuales se limpiaron con pincel de cerda y agua de mar estéril. Aproximadamente 20 g de fragmentos de cada tipo de fronde se colocaron en Erlenmeyers con 300 mL de medio de cultivo PES y se los dejó durante 16 h en las condiciones indicadas previamente. Estas suspensiones fueron agitadas regularmente para evitar la fijación de las esporas al vidrio.

2.2.1. Germinación de carpósporas y tetrásporas

Para estudiar el proceso de germinación de carpósporas y tetrásporas, se inocularon cubreobjetos de vidrio ubicados dentro de cajas de Petri con 20 mL de inóculo, a las que a

su vez se añadieron 20 mL de medio de cultivo PES. Éstas se incubaron en una cámara de cultivo con las condiciones mencionadas previamente. Se usaron tres cajas de Petri para cada tipo de espora y los cubreobjetos inoculados se observaron periódicamente con microscopio óptico. Para calcular el porcentaje de germinación de cada tipo de espora, se contó el número total de esporas y el número de esporas germinadas en cinco campos, con una magnificación de 10x en cada caja de Petri.

2.2.2. Cultivo *in vitro* sobre sustratos artificiales y naturales

Se iniciaron esporocultivos *in vitro*, en una cámara de cultivo con las condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica previamente mencionadas, para evaluar la aptitud de distintos sustratos para la fijación y crecimiento de carpósporas y tetrásporas de *S. crispata* (Fig. 4.1.b).

Se evaluaron dos sustratos artificiales y dos naturales: 1) cubreobjetos de vidrio utilizados como control (vidrio) (Fig. 4.1.c); 2) sogas de nylon de 3 mm de diámetro atadas a un portaobjetos (sogas) (Fig. 4.1.d); 3) conchillas de bivalvos (conchillas) (Fig. 4.1.e) y 4) piedras (Fig. 4.1.f).

Se usaron tres cajas de Petri por cada tipo de espora y sustrato (un total de 24 cajas de Petri). Se colocaron los sustratos sobre el fondo de las cajas de Petri, y luego se agregaron 20 mL de la suspensión de esporas y 20 mL de medio de cultivo PES, de manera que los sustratos estuvieran completamente cubiertos. El medio de cultivo se renovó semanalmente.

Cada semana se tomaron micrografías de los sustratos en lupa binocular para realizar mediciones de densidad de esporas y crecimiento de plántulas con el software de análisis de imágenes Digimizer 4.6.1 (Digimizer 2018).

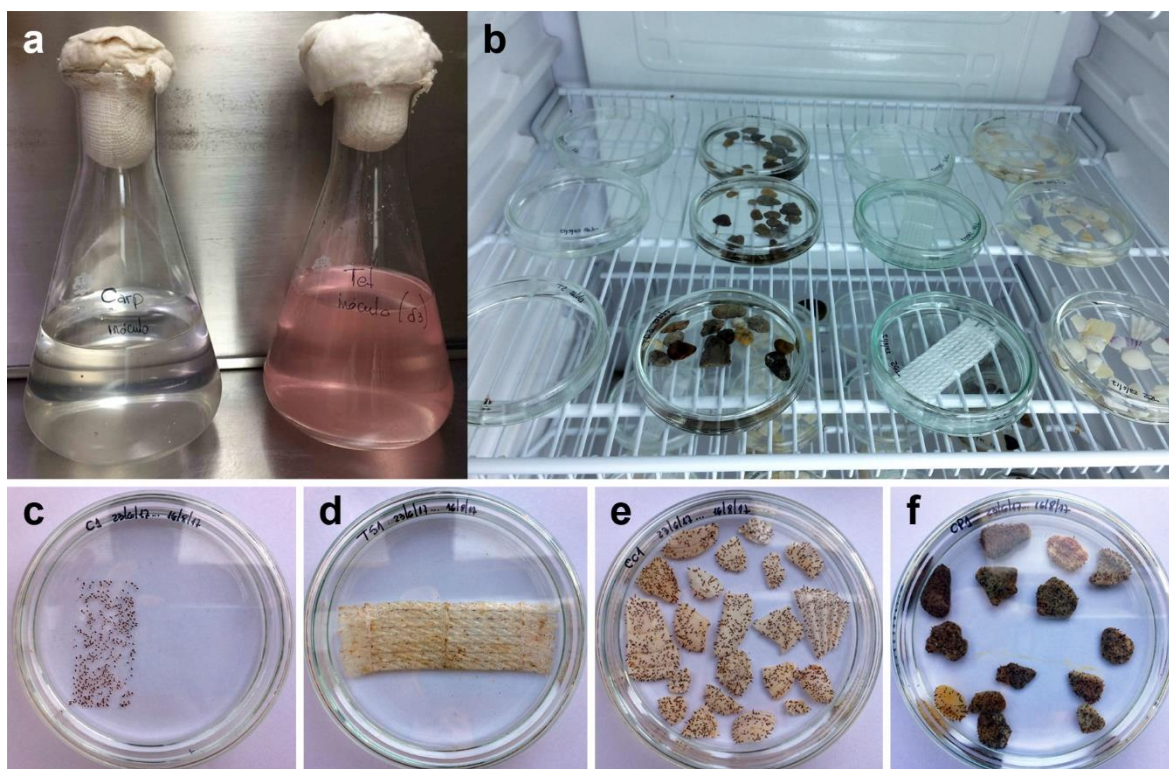


Fig. 4.1. (a) Suspensiones de carpósporas y tetrásporas de *S. crispata* utilizadas para inocular los sustratos. (b) Cajas de Petri con distintos sustratos en cámara de cultivo; detalle de los sustratos evaluados: (c) vidrio, (d) sogas, (e) conchillas, (f) piedras.

2.2.2.1. Densidad y supervivencia de plántulas

Para cada sustrato y tipo de espora se contó la cantidad de esporas asentadas en cinco micrografías de cada caja de Petri y se expresó como esporas cm⁻². Estos recuentos se realizaron semanalmente durante el primer mes y cada dos semanas hasta el tercer mes.

2.2.2.2. Crecimiento de plántulas

El diámetro de los discos basales y la longitud de la porción erecta se midió en cinco micrografías de cada caja de Petri, cada dos semanas y durante tres meses. Se midieron aproximadamente 100 individuos en cada caja de Petri.

Las tasas de crecimiento diarias (TCD [% día⁻¹]) de los discos basales y porciones erguidas se calcularon según la siguiente ecuación (Hansen 1980):

$$TCD = \frac{100 [\ln(l_t/l_0)]}{t}$$

donde l_0 es la longitud inicial, t es el número de días, y l_t es la longitud luego de t días.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como media \pm error estándar. Se llevó a cabo un ANOVA doble para comparar el total de esporas liberadas entre tratamientos y tipos de esporas. Los conteos de esporas se transformaron con raíz cuadrada para lograr homocedasticidad. La densidad de esporas, diámetro, longitud y TCD, se compararon entre sustratos mediante ANOVAs simples. Se aplicó el test Tukey para comparaciones múltiples a posteriori cuando se encontraron diferencias significativas. Como el diámetro y la longitud de las tetrásporas presentaron marcada heterocedasticidad hacia el tercer mes de cultivo, se aplicó el test no paramétrico de Behrens Fisher para realizar comparaciones entre sustratos.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software R 3.4.3 (R Core Team 2017).

3. RESULTADOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Los talos de *Sarcothalia crispata* se encontraron en el submareal (Fig. 4.2.a), a partir del metro de profundidad, y ocasionalmente se pudieron ver ejemplares en fosas de marea del intermareal inferior. Los talos, de color rojizo amarronado, fueron más altos que anchos ($19,67 \pm 2,7$ cm de alto y $8,96 \pm 1,16$ cm de ancho, en promedio), con el ápice afinado (Fig. 4.2.b) y en ocasiones, bífido. Las frondes presentaron el margen dentado, como es característico de la especie (Fig. 4.2.c), sobre todo en la parte basal del talo. Los ejemplares se encontraron sobre sustrato rocoso (Fig. 4.2.a), adheridos al mismo mediante un disco de fijación (Fig. 4.2.d), del cual surge el talo con uno o varios lóbulos.

En corte transversal, el talo presentó una corteza de células pequeñas y pigmentadas, y una médula incolora con espacios intercelulares amplios (Fig. 4.2.d).

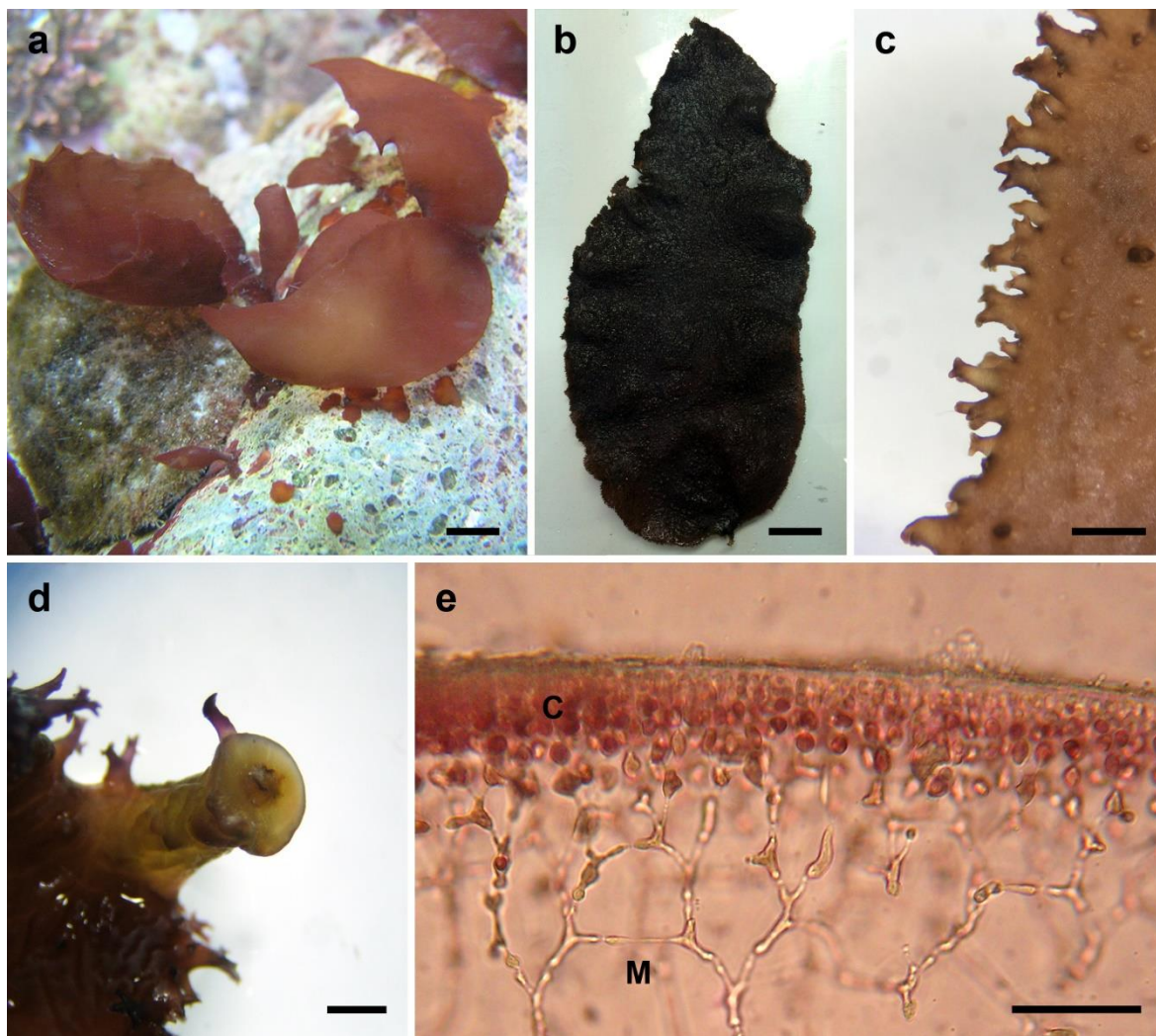


Fig. 4.2. *Sarcothalia crispata*. **(a)** Ejemplares juveniles en su hábitat natural. **(b)** Vista macroscópica de una fronde. **(c)** Detalle del margen del talo dentado. **(d)** Disco de fijación. **(e)** Corte transversal del talo donde se observan las células corticales (C) y parte de la médula (M). Barras escala: a, b = 2 cm; c, d = 2 mm; e = 50 μ m.

3.2. DISPONIBILIDAD DE ESPORAS

3.2.1. Densidad y tamaño de estructuras reproductivas

Las frondes cistocárpicas y tetraspóricas (Fig. 4.3.a, b) resultaron similares en cuanto a tamaño, aunque las primeras presentaron mayor grosor que las segundas ($0,81 \pm 0,03$ mm y $0,51 \pm 0,02$ mm, respectivamente) (Fig. 4.3.e, f). Además, el margen dentado de la fronde no fue tan evidente en los tetrasporofitos como en las frondes cistocárpicas.

El tamaño medio de los cistocarpos fue de $0,69 \pm 0,02$ mm de ancho por $0,51 \pm 0,02$ mm de alto (Fig. 4.3.c, e), mientras que los soros tetrasporangiales fueron más pequeños,

con $0,35 \pm 0,01$ mm de ancho por $0,24 \pm 0,01$ mm de alto (Fig. 4.3.d, f). A su vez, también se observó una diferencia de tamaño entre las distintas esporas, siendo las carpósporas ($22,88 \pm 0,29$ μm , $n = 20$) (Fig. 4.3.g) de mayor tamaño que las tetrásporas ($20,75 \pm 0,17$ μm , $n = 20$) (Fig. 4.3.h).

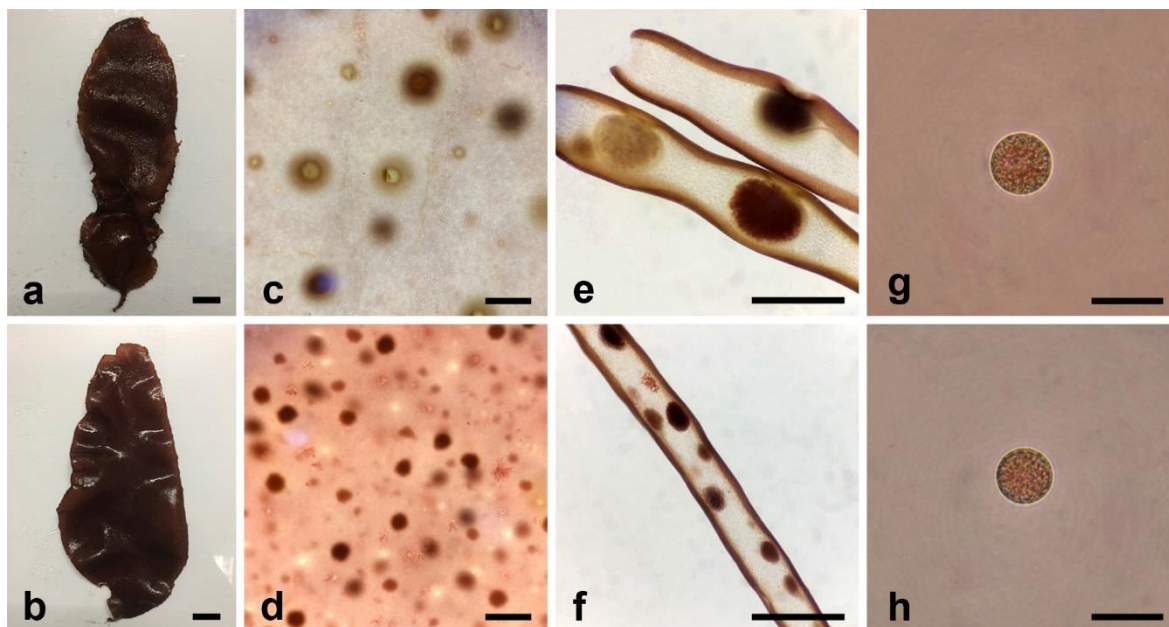


Fig. 4.3. *S. crispata*. **(a)** Talo cistocárpico; **(b)** talo tetraspórico. Vista superficial de las frondes **(c)** cistocárpica y **(d)** tetraspórica. Cortes transversales de **(e)** cistocarpos y **(f)** soros tetrasporangiales. **(g)** Carpóspora; **(h)** tetráspora. Barras escala: a, b = 2 cm; c, d, e, f = 1 mm; g, h = 25 μm .

La densidad promedio de cistocarpos fue $17,1 \pm 6,7$ cistocarpos cm^{-2} y la de soros tetrasporangiales de $150,1 \pm 15,9$ soros cm^{-2} . En ambos tipos de fronde se encontraron cistocarpos y soros inmaduros, maduros y vacíos, siendo en su mayoría inmaduros (Tabla 4.1). Si bien hubo una diferencia notable en la densidad de cistocarpos y de soros tetrasporangiales, las proporciones de soros inmaduros y maduros resultaron prácticamente similares para ambas frondes, notándose una mayor proporción de soros vacíos que de cistocarpos (Fig. 4.4.)

Tabla 4.1. Cistocarpos y soros tetrasporangiales inmaduros, maduros y vacíos. Los datos representan la media \pm error estándar para $n = 15$.

	Inmaduros	Maduros	Vacíos	TOTALES
Cistocarpos	10,7 \pm 5	4,7 \pm 1,7	1,8 \pm 0,6	17,1 \pm 6,7
Soros	78,3 \pm 7,6	40,1 \pm 3,3	31,8 \pm 6,7	150,1 \pm 15,9

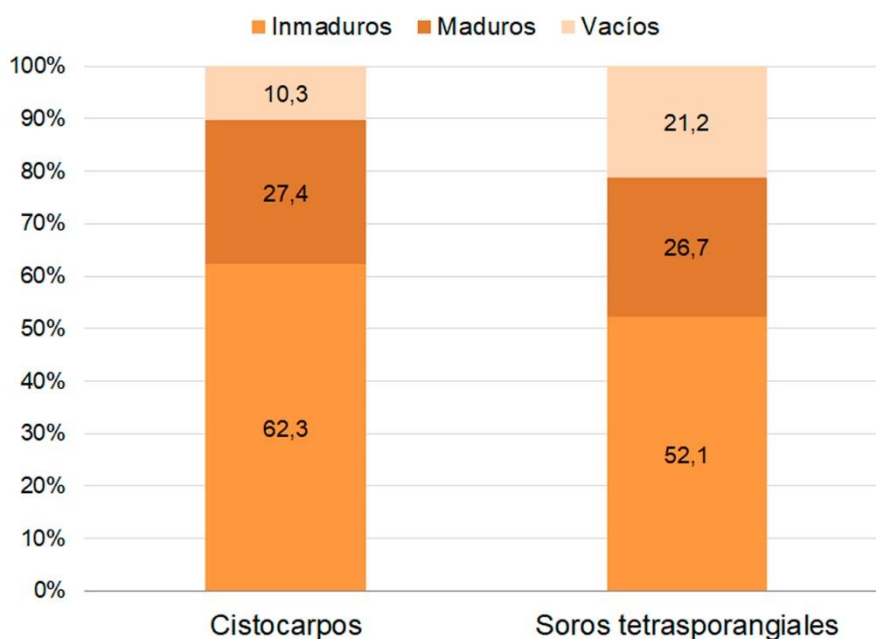


Fig. 4.4. Proporción de cistocarpos y soros tetrasporangiales inmaduros, maduros y vacíos.

3.2.2. Métodos de inducción de la liberación de esporas

No se encontraron diferencias significativas entre métodos de inducción de la esporulación en la cantidad de esporas liberadas por cistocarpo o por soro ($p = 0,647$) (Tabla 4.2; Fig. 4.5.a), ni tampoco en la cantidad de esporas liberadas por área de fronde ($p = 0,871$) (Tabla 4.2; Fig. 4.5.b).

La media de carpósporas liberadas por cistocarpo en cinco días (891 carpósporas por cistocarpo) fue apenas superior que la media de tetrásporas liberadas por soro (588 tetrásporas por soro) ($p < 0,001$) (Fig. 4.5.a). Sin embargo, el número medio de tetrásporas liberadas por área de fronde (46.346 tetrásporas cm^{-2}) fue más de cuatro veces mayor que el número de carpósporas por área (10.214 carpósporas cm^{-2}) ($p < 0,001$) (Fig. 4.5.b).

En cuanto a la periodicidad de la liberación de esporas, no hubo un patrón marcado para las carpósporas, ya que con los métodos de desecación y baja temperatura la liberación de esporas tendió a disminuir con los días, mientras que con liberación espontánea y shock osmótico hubo un pico de liberación en el día cinco (Fig. 4.6.a). Por otro lado, la liberación de tetrásporas mostró un patrón más definido, con picos en el primer, cuarto y quinto día, y con menos liberación en el segundo y tercer día para todos los tratamientos (Fig. 4.6.b).

De esta manera, el 50% de las carpósporas se liberaron en los primeros dos días (Tabla 4.3); sin embargo, las tetrásporas necesitaron entre tres y cuatro días para alcanzar este valor (Tabla 4.4).

Tabla 4.2. Carpósporas y tetrásporas totales liberadas en cinco días por estructura reproductiva o cm^2 de fronde, con distintos métodos de inducción. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 4$.

Método	Carpósporas		Tetrásporas	
	por cistocarpa	por cm^2	por soro	por cm^2
Espontánea	979,8 \pm 64,2	10.787,5 \pm 1.324,1	594,6 \pm 55,1	48.593,7 \pm 6.281,4
Desecación	813,8 \pm 100,9	9.535,5 \pm 940,2	574 \pm 55,6	43.735,2 \pm 5.110,7
Salinidad	972,9 \pm 190,9	11.306,4 \pm 2.727,3	597,7 \pm 46,6	45.715,5 \pm 4.435,1
Temperatura	797,1 \pm 80,3	9.225,7 \pm 1.007,5	584,7 \pm 35,9	47.339,6 \pm 3.503,2

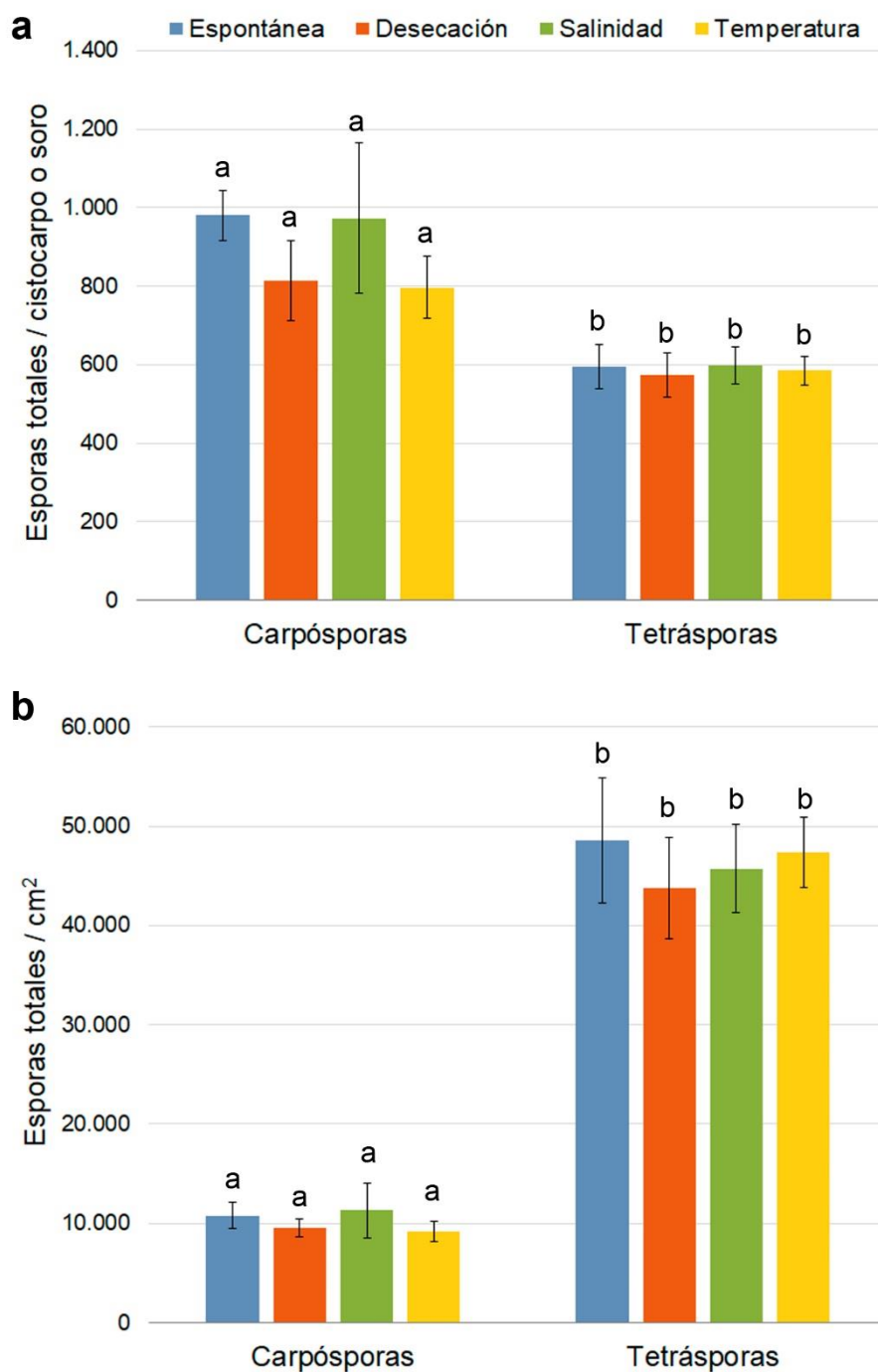


Fig. 4.5. Liberación de esporas total (en cinco días) con los distintos métodos de inducción. **(a)** Esporas por cistocarpo o soro tetrasporangial. **(b)** Esporas por cm² de fronde. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 4$.

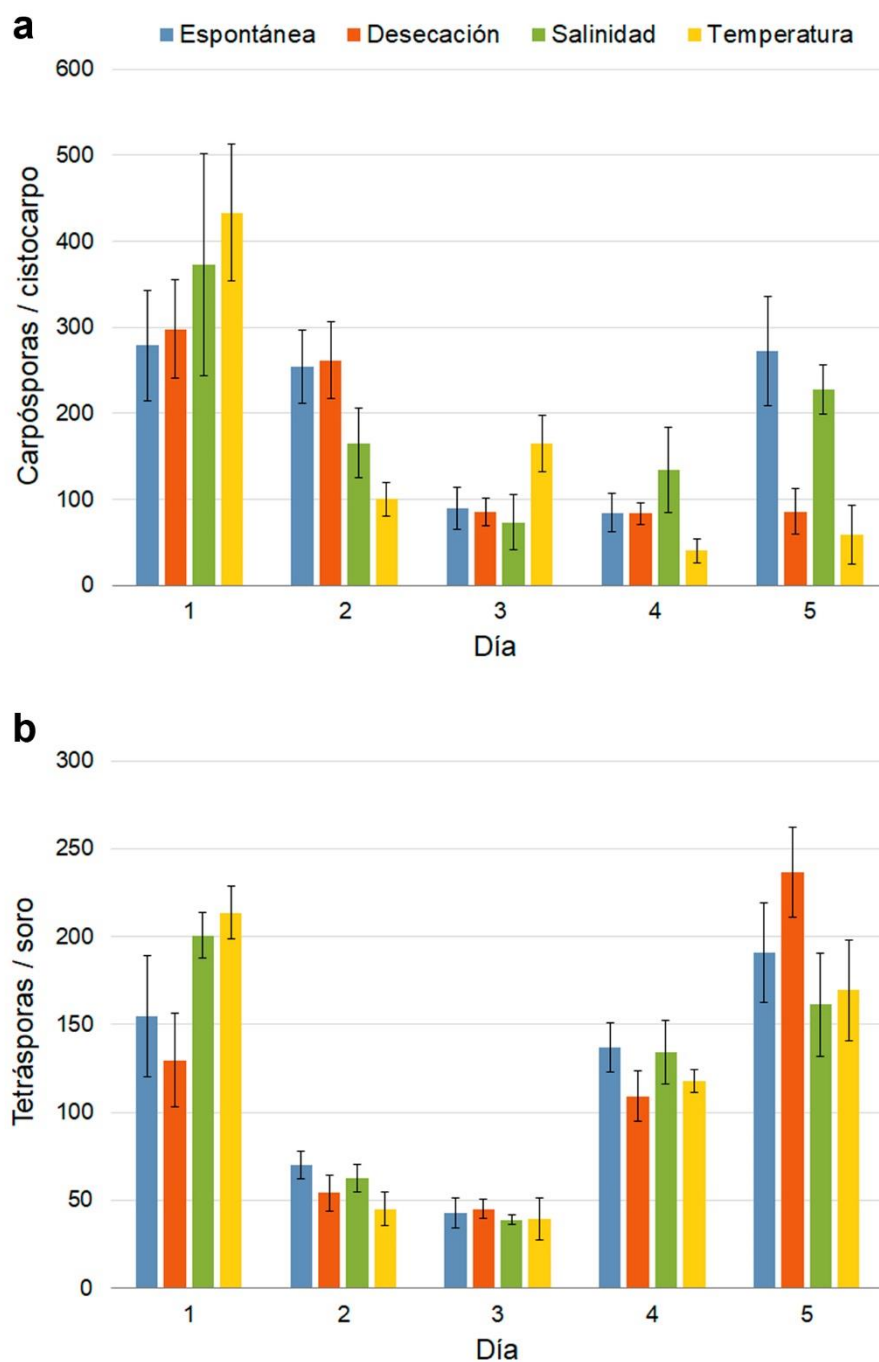


Fig. 4.6. Liberación diaria de esporas con distintos métodos de inducción. **(a)** Carpósporas por cistocarpo. **(b)** Tetrásporas por soro. Los valores son la media \pm error estándar para $n = 4$.

Tabla 4.3. Porcentaje acumulado de carpósporas liberadas durante los sucesivos días de liberación, tomando como 100% el total liberado a los cinco días.

Día	Método de inducción			
	Espontánea	Dsecación	Salinidad	Temperatura
1	28,5	36,6	38,3	54,4
2	54,4	68,7	55,3	67,0
3	63,6	79,2	62,8	87,6
4	72,2	89,5	76,6	92,7
5	100	100	100	100

Tabla 4.4. Porcentaje acumulado de tetrásporas liberadas durante los sucesivos días de liberación, tomando como 100% el total liberado a los cinco días.

Día	Método de inducción			
	Espontánea	Dsecación	Salinidad	Temperatura
1	25,97	22,57	33,59	36,53
2	37,73	31,97	44,07	44,19
3	44,89	39,78	50,57	50,91
4	67,9	58,79	73,02	71,03
5	100	100	100	100

3.3. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO

3.3.1. Germinación de carpósporas y tetrásporas

El patrón de germinación de ambos tipos de esporas fue del tipo Dumontia. En la Figura 4.7 se muestra la germinación de las carpósporas.

Las carpósporas (Fig. 4.7.a) comenzaron a dividirse inmediatamente luego de la liberación. La primera división ocurrió perpendicular al sustrato, dentro de los tres primeros días (Fig. 4.7.b). En el día cuatro se observaron estadios de tres células, con la segunda división perpendicular a la primera (Fig. 4.7.c). El siguiente estadio, de cuatro células, tuvo un diámetro de $24,58 \pm 0,77 \mu\text{m}$ (Fig. 4.7.d). Hacia el final de la primera semana se alcanzó un estadio multicelular, sin aumento significativo en tamaño ($26,79 \pm 1,15 \mu\text{m}$) (Fig. 4.7.e).

Posteriormente ocurrieron más divisiones y, en el día 19 las plántulas mostraron células periféricas alargadas, alcanzando $55,38 \pm 3,16 \mu\text{m}$ (Fig. 4.7.f). Divisiones ulteriores dieron origen a un disco multicelular en el día 22 (Fig. 4.7.g), que continuó creciendo para formar un disco hemisférico de $125,44 \pm 7,03 \mu\text{m}$ hacia el final del primer mes (Fig. 4.7.h). A partir de este momento, comenzó a observarse coalescencia entre los discos basales (Fig. 4.7.i). Entre la cuarta y quinta semana desarrolló la porción erguida, creciendo desde el centro del disco basal (Fig. 4.7.j), el cual alcanzó un diámetro de $161,96 \pm 11,46 \mu\text{m}$. Al segundo mes, los discos basales alcanzaron un diámetro de $411,86 \pm 14,61 \mu\text{m}$ y la porción erguida $485,39 \pm 42,47 \mu\text{m}$ de largo (Fig. 4.7.k). En el tercer mes los discos basales llegaron a medir $0,77 \pm 0,09 \text{ mm}$ de diámetro y las porciones erguidas $3,71 \pm 0,4 \text{ mm}$ de longitud (Fig. 4.7.l).

La germinación, tanto de carpósporas como de tetrásporas, no fue sincronizada, pudiéndose observar simultáneamente esporas en distintos estadios de germinación. A pesar de que las tetrásporas siguieron el mismo patrón de germinación que las carpósporas, el proceso llevó más tiempo en las primeras. Mientras que el $60 \pm 6\%$ de las carpósporas comenzaron a dividirse en el tercer día, solo el $23 \pm 3\%$ de las tetrásporas comenzaron a germinar en ese momento. Al final de la primera semana, $97 \pm 2\%$ de las carpósporas habían germinado, pero solo un $40 \pm 4\%$ de las tetrásporas habían comenzado a dividirse. Hacia el final de la segunda semana, las carpósporas mostraron un $99 \pm 1\%$ de germinación, mientras que las tetrásporas solo el $68 \pm 4\%$.

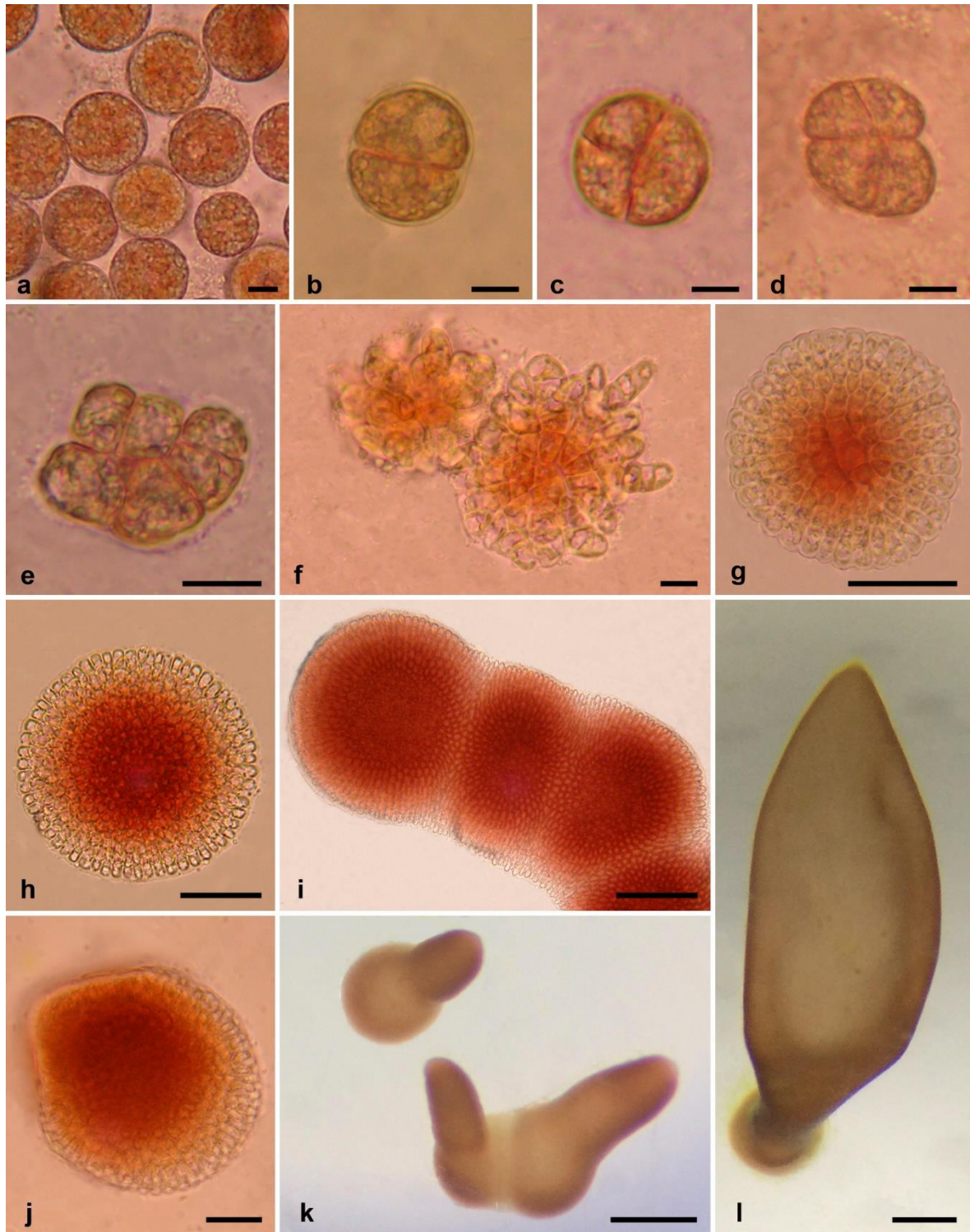


Fig. 4.7. Proceso de germinación de carpósporas de *S. crispata*. **(a)** carpósporas, **(b)** estadio bicelular, **(c)** estadio tricelular, **(d)** estadio tetracelular, **(e-h)** estadios multicelulares, **(i)** coalescencia de los discos basales, **(j)** desarrollo temprano de la porción erguida del talo, **(k)** plántulas de dos meses, **(l)** plántulas de tres meses. Barras escala: a-f = 10 μm ; g-j = 40 μm ; k = 250 μm ; l = 500 μm .

3.3.2. Cultivo *in vitro* sobre sustratos artificiales y naturales

Los cuatro sustratos evaluados (vidrio, sogas, conchillas y piedras) permitieron el establecimiento y crecimiento tanto de carpósporas como de tetrásporas (Fig. 4.8).

3.3.2.1. Densidad y supervivencia de plántulas

La mayor densidad inicial de carpósporas se observó sobre vidrio, mientras que la menor se dio sobre piedras ($p = 0,002$) (Fig. 4.9.a). Sin embargo, la mayor supervivencia de plántulas ocurrió sobre piedras, mientras que la menor se dio sobre sogas (Tabla 4.5). Como consecuencia, al tercer mes de cultivo, la densidad de tetrasporofitos juveniles (generados a partir de carpósporas germinadas) sobre piedras, conchillas y vidrio fue significativamente mayor que sobre sogas ($p = 0,027$) (Fig. 4.9.a).

En cuanto a las tetrásporas, el vidrio, conchillas y piedras mostraron densidades iniciales similares, siendo significativamente mayores que la observada en sogas ($p = 0,002$) (Fig. 4.9.b). La supervivencia de tetrásporas fue muy baja para los cuatro sustratos evaluados, con un promedio de 4,77% (Tabla 4.5). En el tercer mes de cultivo, las conchillas, piedras y sogas mostraron densidades significativamente mayores que la observada sobre vidrio ($p = 0,01$).

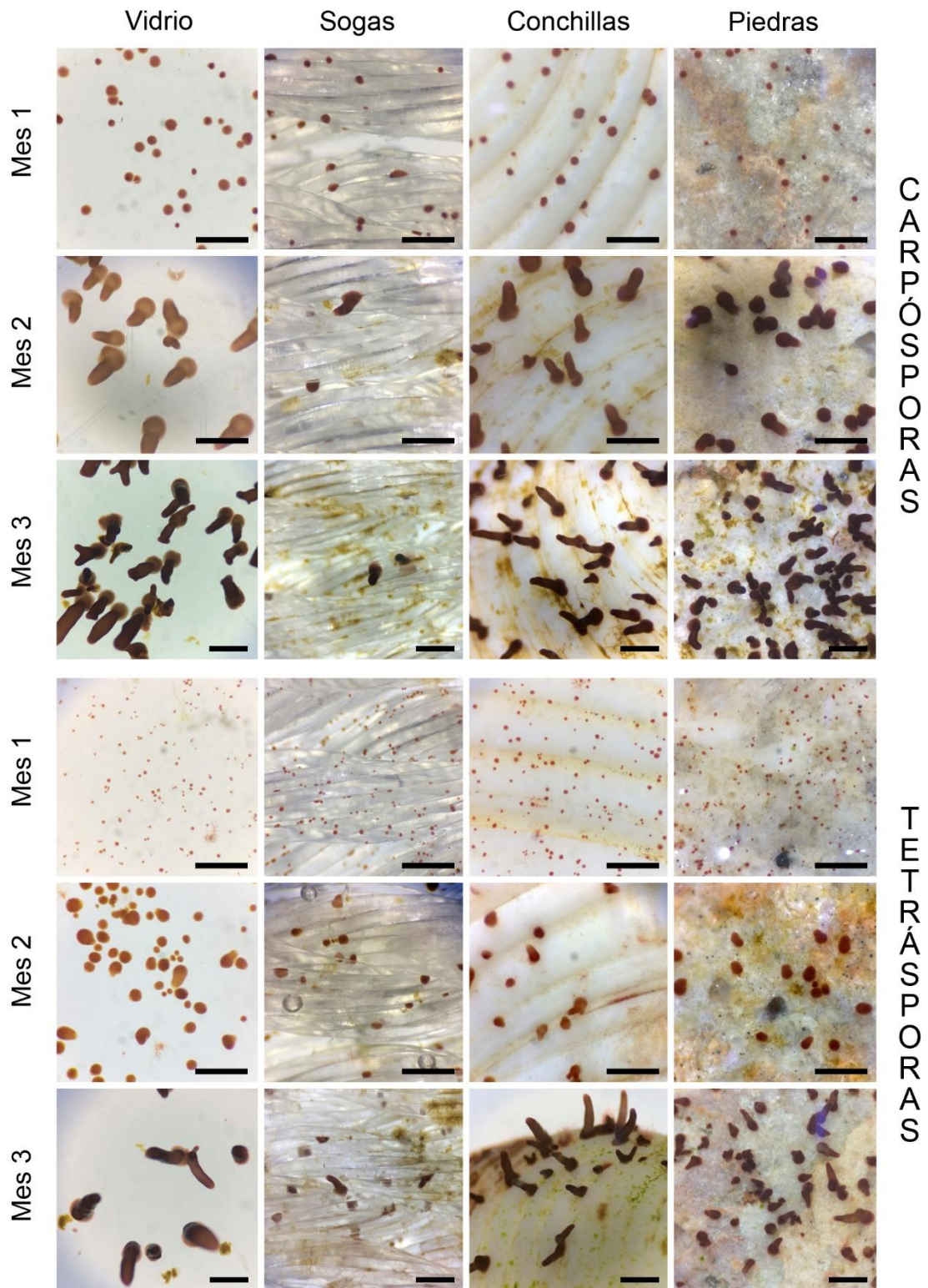


Fig. 4.8. Desarrollo de tetrasporofitos (a partir de carpósporas) y gametofitos (a partir de tetrásporas) de *S. crispata* sobre distintos sustratos artificiales (vidrio, sogas) y naturales (conchillas, piedras), y en distintos estadios de desarrollo (1er, 2do y 3er mes de cultivo *in vitro*). Barras escala = 1 mm.

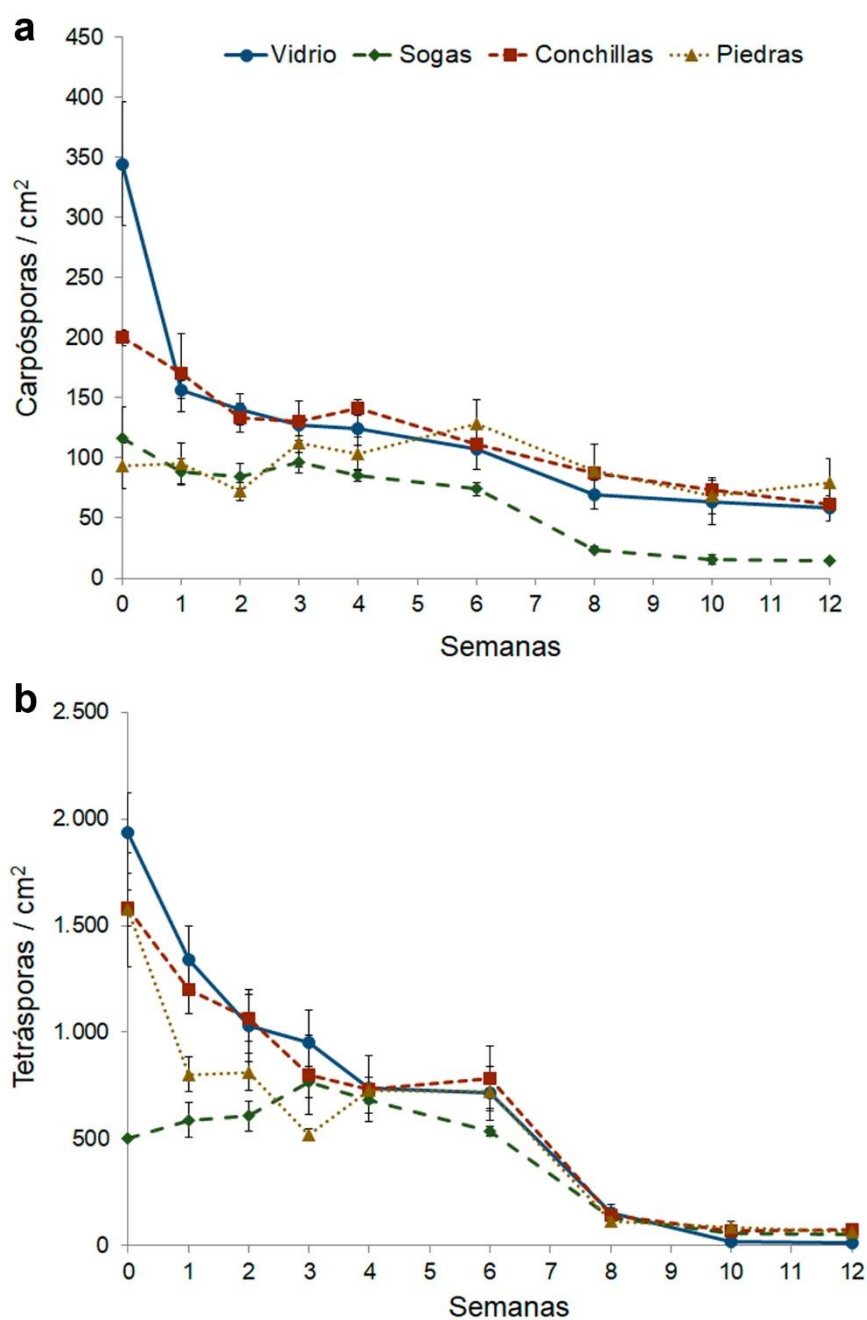


Fig. 4.9. Densidad de **(a)** carpósporas y **(b)** tetrásporas de *S. crispata* sobre distintos sustratos. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

Tabla 4.5. Supervivencia (%) de plántulas sobre distintos sustratos luego de tres meses en cultivo *in vitro*. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

	Vidrio	Sogas	Conchillas	Piedras
Carpósporas	17,55 \pm 3,99	12,97 \pm 1,15	30,59 \pm 2,04	88,23 \pm 21,02
Tetrásporas	0,61 \pm 0,16	9,91 \pm 2,71	4,61 \pm 0,23	3,92 \pm 0,17

3.3.2.2. Crecimiento de plántulas

Los discos basales originados a partir de carpósporas (Fig. 4.10.a) desarrollaron mejor sobre vidrio que en el resto de los sustratos evaluados, alcanzando un diámetro de $0,56 \pm 0,04$ mm al tercer mes de cultivo; siendo significativamente mayores que los desarrollados sobre sogas ($0,37 \pm 0,05$ mm) ($p = 0,048$). Los discos basales desarrollados a partir de tetrásporas (Fig. 4.10.b) resultaron de mayor diámetro creciendo sobre vidrio ($0,49 \pm 0,1$ mm) que sobre sogas ($0,27 \pm 0,02$ mm) ($p = 0,034$). Para ambos tipos de esporas, los discos basales presentaron un tamaño intermedio sobre conchillas y piedras.

La porción erguida del talo comenzó a crecer en la cuarta semana para carpósporas (Fig. 4.11.a) y en la sexta para tetrásporas (4.11.b). En el tercer mes de cultivo, los tetrasporofitos sobre vidrio alcanzaron $1,007 \pm 0,1$ mm de longitud, significativamente mayor que sobre sogas ($0,54 \pm 0,06$ mm) y que en piedras ($0,52 \pm 0,07$ mm) ($p = 0,005$). En cuanto a los gametofitos, en el tercer mes de cultivo alcanzaron mayor longitud sobre vidrio ($0,85 \pm 0,25$ mm) y menor sobre sogas ($0,34 \pm 0,05$ mm) ($p < 0,05$).

La tasa de crecimiento diaria (TCD) para los discos basales de tetrasporofitos (Fig. 4.12.a) fue mayor entre la segunda y cuarta semanas de cultivo, con un promedio de $8,14\%$ día⁻¹, no habiendo diferencias significativas entre sustratos ($p = 0,078$). La TCD para los discos basales gametofíticos (Fig. 4.12.b), fue mayor entre la cuarta y sexta semanas de cultivo, con una media de $7,01\%$ día⁻¹, no habiendo diferencias significativas entre sustratos ($p = 0,773$). En las dos primeras semanas, la TCD fue mucho mayor para tetrasporofitos (4% día⁻¹) que para gametofitos ($0,49\%$ día⁻¹).

En cuanto a la longitud de la porción erguida del talo, la mayor TCD para tetrasporofitos (Fig. 4.13.a) se observó al principio de la elongación de la porción erguida, entre la cuarta y sexta semana de cultivo ($6,52\%$ día⁻¹), sin diferencias significativas entre sustratos ($p = 0,826$). La mayor TCD para la longitud de gametofitos (Fig. 4.13.b) se registró entre la sexta y octava semana de cultivo ($4,05\%$ día⁻¹), sin haberse encontrado diferencias significativas entre sustratos ($p = 0,09$).

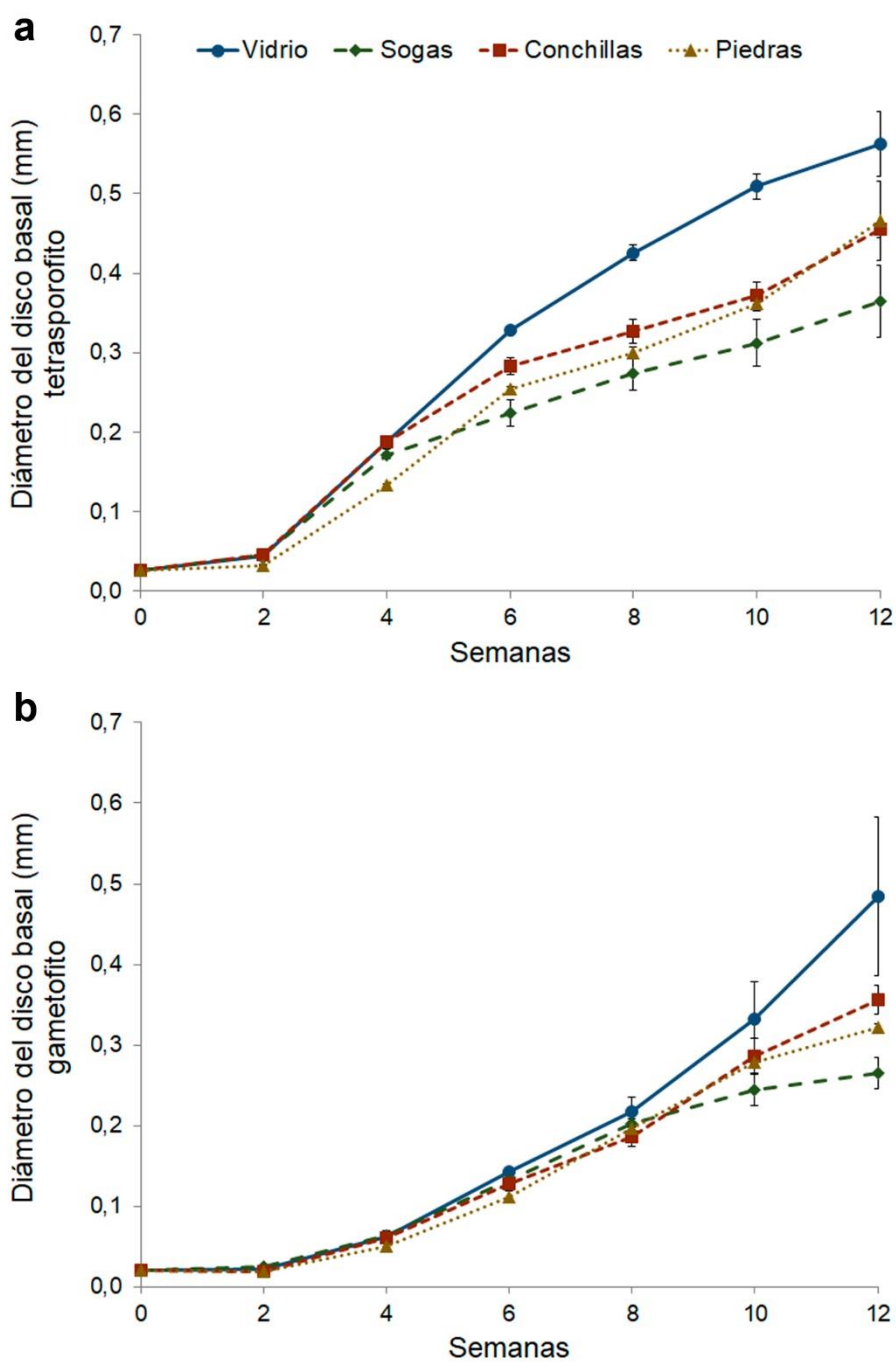


Fig. 4.10. Crecimiento de *S. crispata* sobre distintos sustratos. **(a)** Disco basal tetraspórico. **(b)** Disco basal gametofítico. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

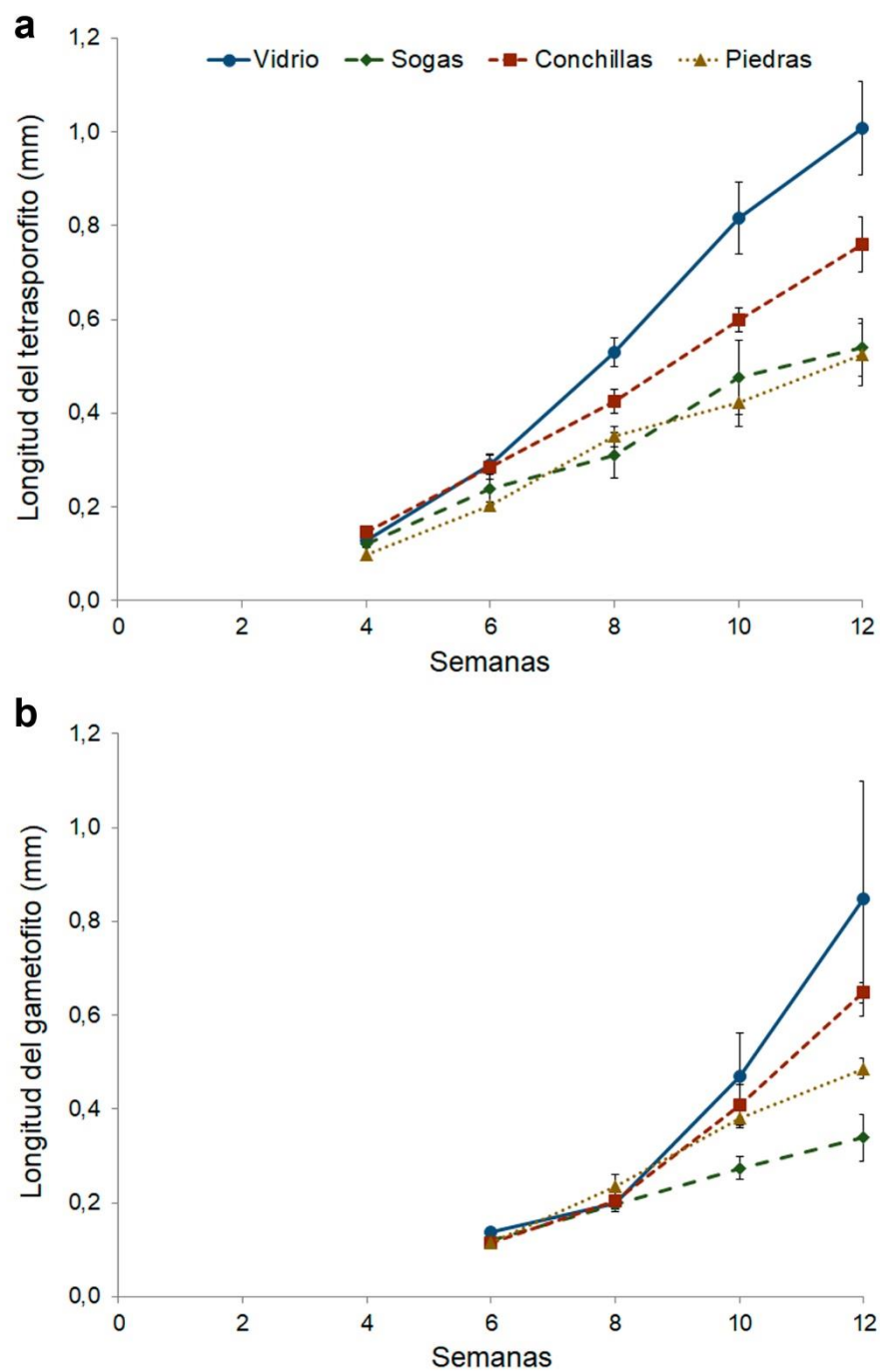


Fig. 4.11. Crecimiento en longitud de *S. crispata* sobre distintos sustratos. **(a)** Plántula tetraspórica. **(b)** Plántula gametofítica. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

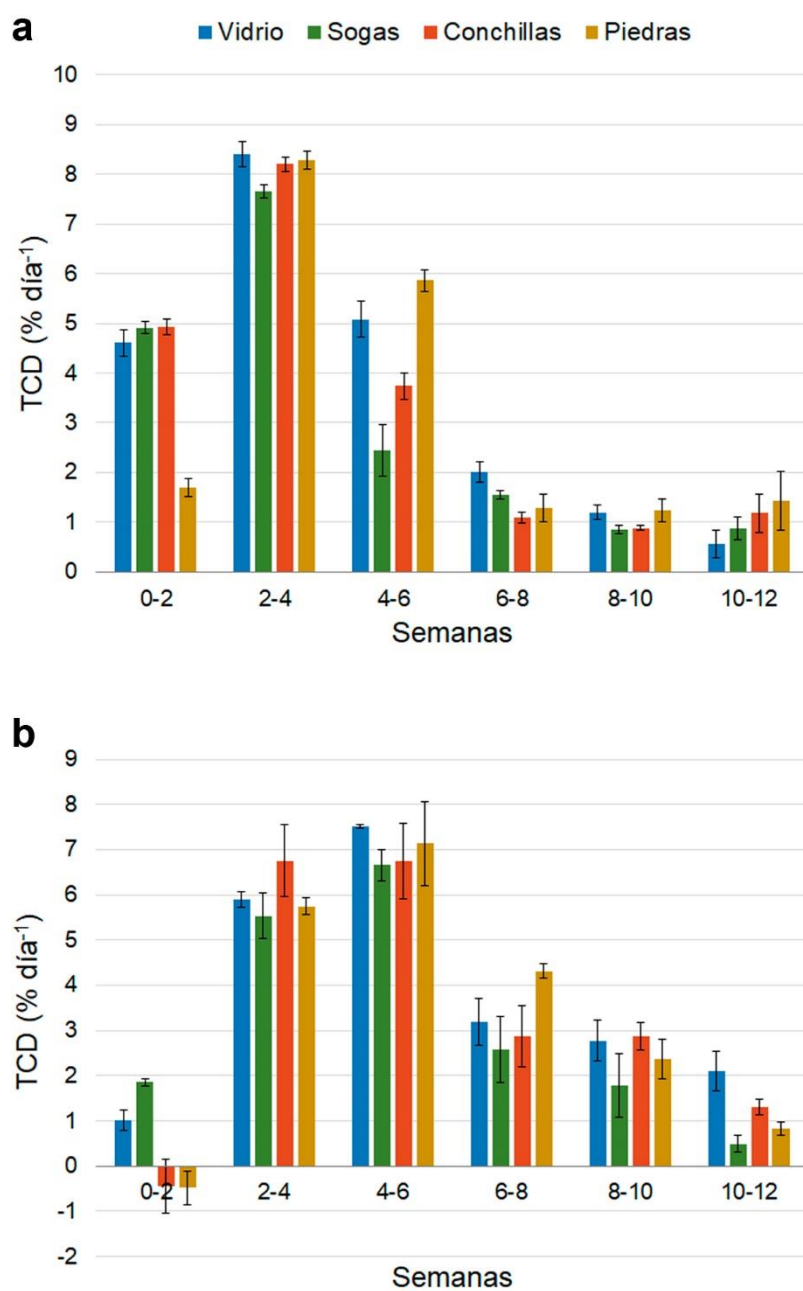


Fig. 4.12. TCD de *S. crispata* sobre distintos sustratos. **(a)** Disco basal tetraspórico. **(b)** Disco basal gametofítico. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

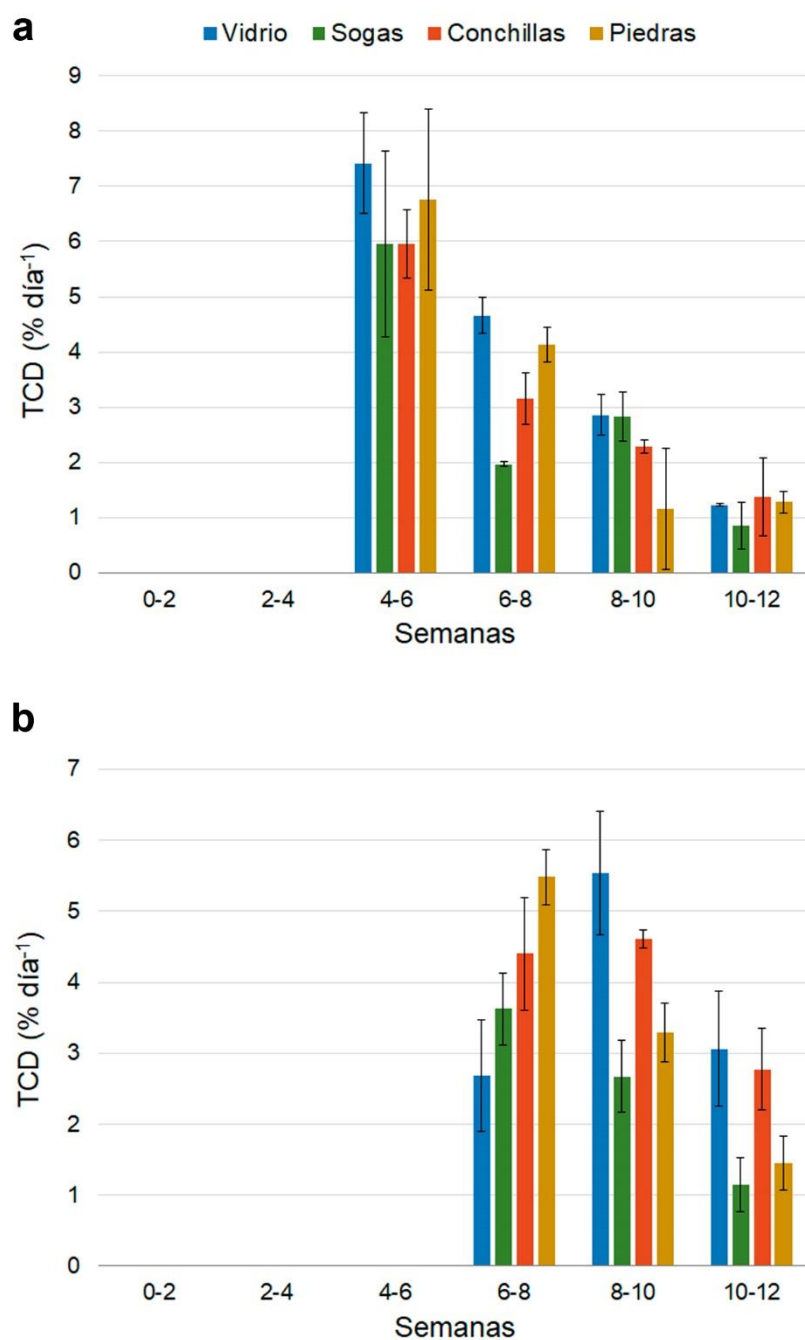


Fig. 4.13. TCD de *S. crispata* sobre distintos sustratos. **(a)** Plántula tetraspórica. **(b)** Plántula gametofítica. Los valores representan la media \pm error estándar para $n = 3$.

4. DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias en la cantidad de esporas liberadas entre los métodos de desecación parcial, shock osmótico, baja temperatura y liberación espontánea. En un estudio realizado en *Iridaea ciliata* (ahora *Sarcothalia crispata*), la liberación de carpósporas resultó mayor cuando las frondes se trataron con desecación parcial, en comparación con alta salinidad y oscuridad (Infante y Candia 1988). El método de desecación parcial ha sido utilizado en numerosas especies de macroalgas para inducir la liberación de esporas (Avila et al. 1999a; Romo et al 2001; Mansilla et al. 2008; Bulboa et al. 2010). Sin embargo, éste no siempre resulta en una mayor cantidad de esporas liberadas, como se observó por ejemplo en *Hypnea musciformis*, en la cual se obtuvo mayor liberación de carpósporas cuando no se aplicó desecación (Prataprao Shere 1985).

El valor máximo de carpósporas liberadas en *S. crispata* por día (980 esporas / cistocarpo), resultó menor que el valor máximo reportado para la misma especie de la costa Pacífica (4.500 esporas / cistocarpo) (Infante y Candia 1988). Esto podría atribuirse a diferentes grados de maduración de las frondes reproductivas.

A diferencia de lo que ocurre con las tetrásporas, los altos valores de carpósporas liberadas durante los primeros dos días, indican que no es necesario mantener los talos liberando esporas durante largo tiempo para obtener densidades adecuadas para iniciar cultivos. Esto evitaría posibles contaminantes y el desarrollo de epífitos que pueden estar presentes sobre las frondes fértiles.

La cantidad de tetrásporas liberadas por área de fronde fue mucho mayor que la de carpósporas, debido posiblemente a la mayor densidad de soros tetrasporangiales que de cistocarpos. Esta diferencia en la esporulación es importante para iniciar esporocultivos, ya que se necesitará menor biomasa tetraspórica que cistocárpica para obtener una densidad determinada de inóculo. Como se mencionó anteriormente, al igual que en *Gigartina skottsbergii*, los gametofitos de *S. crispata* producen carragenanos del tipo Kappa/Iota- y los tetrasporofitos carragenanos del tipo Lambda-. De esta manera, dependiendo del tipo de espora con que se inoculen los sustratos, se puede obtener biomasa específica de determinada fase del ciclo de vida (Fig. 3.14) para la extracción de un determinado tipo de carragenano.

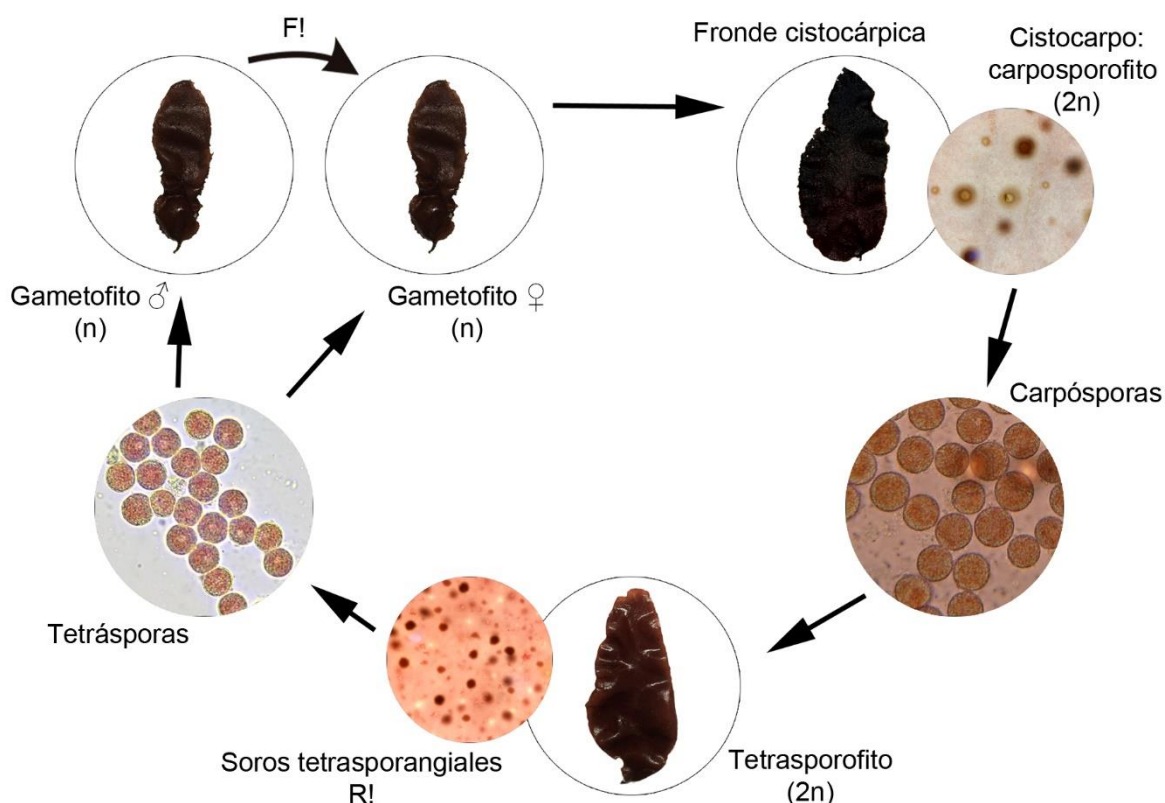


Fig. 3.14. Ciclo de vida de *S. crispata*. F!: fecundación; R!: meiosis; n: haploide; 2n: diploide.

En este estudio se evaluaron dos sustratos artificiales y dos naturales para el asentamiento y crecimiento de carpósporas y tetrásporas de *S. crispata*. Si bien las esporas recién liberadas presentaron un buen asentamiento sobre vidrio, las mejores densidades al cabo de tres meses de cultivo se obtuvieron en conchillas y piedras, ambos sustratos naturales. En general, las esporas no presentaron buena fijación sobre sogas. Este estudio concuerda con otro realizado en la misma especie en el sur de Chile, en el cual mayores densidades de plántulas se desarrollaron sobre rocas y conchillas de almejas que en sogas de polipropileno (Avila et al. 1996). Además, Infante y Candia (1988) observaron que a pesar de que las tetrásporas de *S. crispata* se asentaban sobre redes de pesca, solo sobrevivían por una semana, mientras que sobre conchillas y guijarros desarrollaban adecuadamente hasta la formación de una porción erguida. Romo y Alveal (1995) también indicaron en *Iridaea* que los sustratos rugosos facilitaron la adhesión de las esporas y el desarrollo de los discos basales antes de ser transportados al mar. De igual modo, en *Gracilaria gracilis*, las carpósporas presentaron mejor asentamiento sobre conchillas, con una superficie rugosa que, sobre canto rodado, con una superficie más lisa y redondeada (Hughes et al. 2014). Un comportamiento similar se observó en la especie tropical *G.*

parvispora, la cual presentó mejor asentamiento sobre fragmentos de coral que sobre canto rodado (Glenn et al. 1996). Esta preferencia por superficies rugosas podría deberse a una mayor protección, y por ende supervivencia, ante condiciones ambientales adversas (Fletcher y Callow 1992).

Las plántulas desarrolladas a partir de la germinación de carpósporas y tetrásporas presentaron mayores dimensiones sobre vidrio, tanto en el diámetro del disco basal como en la longitud de la porción erguida; mientras que sobre sustratos naturales alcanzaron dimensiones intermedias entre el vidrio y las sogas. Romo et al. (2001), en la misma especie en Chile, obtuvieron gametofitos de 0,23 mm de diámetro luego de dos meses de crecimiento bajo condiciones similares a las utilizadas en el presente estudio. Por otro lado, Mansilla et al. (2006) reportaron gametofitos de 3,77 de longitud luego de tres meses de crecimiento. En el presente estudio los gametofitos alcanzaron un diámetro del disco basal de 0,49 mm y una longitud de la porción erguida de 0,85 luego de tres meses en cultivo; mientras que los tetrasporofitos alcanzaron dimensiones mayores, con 0,56 mm de diámetro del disco basal y 1,007 mm de longitud.

Sustratos artificiales como sogas y redes han sido empleados frecuentemente para el cultivo de macroalgas, tanto a partir de esporas como por propagación vegetativa (Alveal et al. 1995; Romo y Alveal 1995; Buschmann et al. 2001b; Buschmann et al. 2008). Sin embargo, a la hora de iniciar cultivos en el mar es preferible emplear sustratos que no tengan un posible efecto negativo sobre el medio ambiente. En este estudio, las piedras y conchillas presentaron la mayor supervivencia de carpósporas, mientras que las sogas presentaron la menor supervivencia. Avila et al. (1996) obtuvieron resultados similares, con mayor supervivencia en canto rodado y conchillas (77 y 60% de supervivencia, respectivamente) que en sogas (17-23% de supervivencia, dependiendo del diámetro de la soga). Con respecto a los tetrasporofitos, no hubo diferencias entre sustratos, con una supervivencia muy baja. Estos resultados difirieron con los obtenidos por Avila et al. (1996), los cuales fueron similares a los resultados obtenidos con las carpósporas en este estudio. A pesar de que las densidades iniciales de tetrásporas fueron mayores que las de carpósporas (debido a densidades diferentes de los inóculos), al cabo de tres meses las densidades de plántulas gametofíticas y tetraspóricas resultaron similares en el presente estudio, lo que concuerda con la alta mortalidad obtenida en gametofitos, comparada con la de tetrasporofitos. La baja supervivencia de gametofitos coincide con los resultados obtenidos por Romo et al. (2001), donde encontraron alta mortalidad de gametofitos de *S. crispata* en la primera semana de cultivo *in vitro* (73-93% de mortalidad), lo cual fue atribuido a la presencia de tetrásporas inmaduras. La disminución de la densidad de plántulas con el tiempo es común en macroalgas, al igual que en otros organismos sésiles,

ya que grandes cantidades de propágulos mueren luego del asentamiento y durante el desarrollo temprano, al no ser capaces de cambiar de hábitat ante condiciones adversas (Santelices 1990). La coalescencia de discos basales observada en este estudio, ayudaría a incrementar la supervivencia de las plántulas durante el reclutamiento (Santelices et al. 1999, 2003).

A pesar de que las carpósporas y tetrásporas mostraron el mismo patrón de germinación, el proceso resultó más lento para las tetrásporas. Esto se ve reflejado en la TCD de las primeras dos semanas, la cual fue mucho menor para tetrásporas que para carpósporas. Similares resultados fueron reportados por González-Zuñiga (2004) en *S. crispata* proveniente de Chile, así como en la carragenófito *Chondracanthus chamissoi* (Avila et al. 2011). Esta diferencia en el crecimiento podría estar relacionada con la diferente ploidía de las dos generaciones, ya que la germinación de carpósporas da lugar a tetrasporofitos diploides que, de acuerdo a Santelices (1990), tendrían mayor vigor que los gametofitos haploides originados a partir de tetrásporas. Sin embargo, esto no explicaría la dominancia gametofítica que normalmente ocurre en poblaciones naturales de Gigartinales. Por otro lado, Hannach y Santelices (1985) encontraron en *Iridaea* que, en el primer mes de cultivo, los tetrasporofitos crecieron más rápido que los gametofitos, pero en las subsiguientes semanas, los gametofitos alcanzaron mayores dimensiones que los tetrasporofitos.

En el presente estudio, las mayores tasas de crecimiento para la elongación de la porción erguida de las plántulas de *S. crispata* se obtuvieron al inicio del cultivo, similar a lo reportado por Mansilla et al. (2004), quienes encontraron que las mayores tasas de crecimiento ocurrían en los primeros 30 días de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la liberación espontánea sería un método adecuado para obtener carpósporas y tetrásporas en *S. crispata*. Este método es menos costoso y requiere de menos esfuerzo y tiempo que los demás métodos evaluados. Además, sustratos naturales, como conchillas o piedras, resultaron propicios para la adhesión de ambos tipos de esporas y su posterior desarrollo.

CAPÍTULO 5

**Carragenanos de *Gigartina skottsbergii* y
Sarcothalia crispata: análisis estructural
y formación de complejos interpolielectrolito
para la liberación controlada de ingredientes
farmacéuticos activos**

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocoloides de la familia de los carragenanos son galactanos sulfatados que consisten en unidades alternantes de β -D-galactopiranosas unidas en la posición 3 y de α -D-galactopiranosas unidas en la posición 4, pudiendo estar esta última como tal o como 3,6-anhidro- α -D-galactopiranosas, y los grupos hidroxilo sustituidos por diferentes grupos, principalmente sulfato (Usov 2011). Según la presencia o ausencia de 3,6-anhidrogalactosa y la cantidad y posición de los grupos sulfato, los carragenanos se clasifican en seis familias básicas: iota (I-), kappa (κ -), lambda (λ -), mu (μ -), nu (v-) y theta (θ -) (Campo et al. 2009) (Fig. 5.1).

Comercialmente, los tres tipos principales de carragenanos son κ -, I- y λ -carragenano. En algunas especies de algas los carragenanos κ - y I- se encuentran formando estructuras híbridas del tipo κ -I-, y a su vez están junto a sus precursores biosintéticos, μ - y v-carragenano (Pereira y Ribeiro-Claro 2015). Cada uno de estos tipos tiene propiedades particulares. Los carragenanos κ - e I- se caracterizan por formar geles en soluciones acuosas: el κ -carragenano forma geles rígidos, fuertes y quebradizos y el I-carragenano forma geles blandos y débiles; por otro lado, el λ -carragenano, al igual que los precursores μ - y v-, no gelifican, sino que funcionan como agentes espesantes (Pereira y Ribeiro-Claro 2015).

Los usos de estos polisacáridos son muy variados. En la industria alimentaria tienen amplias aplicaciones por sus propiedades espesantes, gelificantes y estabilizantes, incluyéndose en la formulación de productos lácteos, soluciones acuosas, carnes procesadas y alimento para mascotas (Mc Hugh 2003). También son utilizados en productos no alimentarios como formulaciones farmacéuticas, cosméticas, de imprenta y textiles (Campo et al. 2009). Por ejemplo, se emplean en la fabricación de dentífrico, geles desodorantes de ambiente, cremas cosméticas, entre otros. Además, los carragenanos han demostrado tener propiedades bioactivas como agentes antivirales (Carlucci et al. 1997; Damonte et al. 2004), antitumorales (Zhou et al. 2004), antioxidantes (Usov 2011) y anticoagulantes (Carlucci et al. 1997). Asimismo, resultan útiles como excipientes en la preparación de comprimidos, por su alta compatibilidad, robustez y viscoelasticidad persistente durante la compresión, siendo de esta manera adecuados para formulaciones de liberación controlada (Campo et al. 2009; Li et al. 2014).

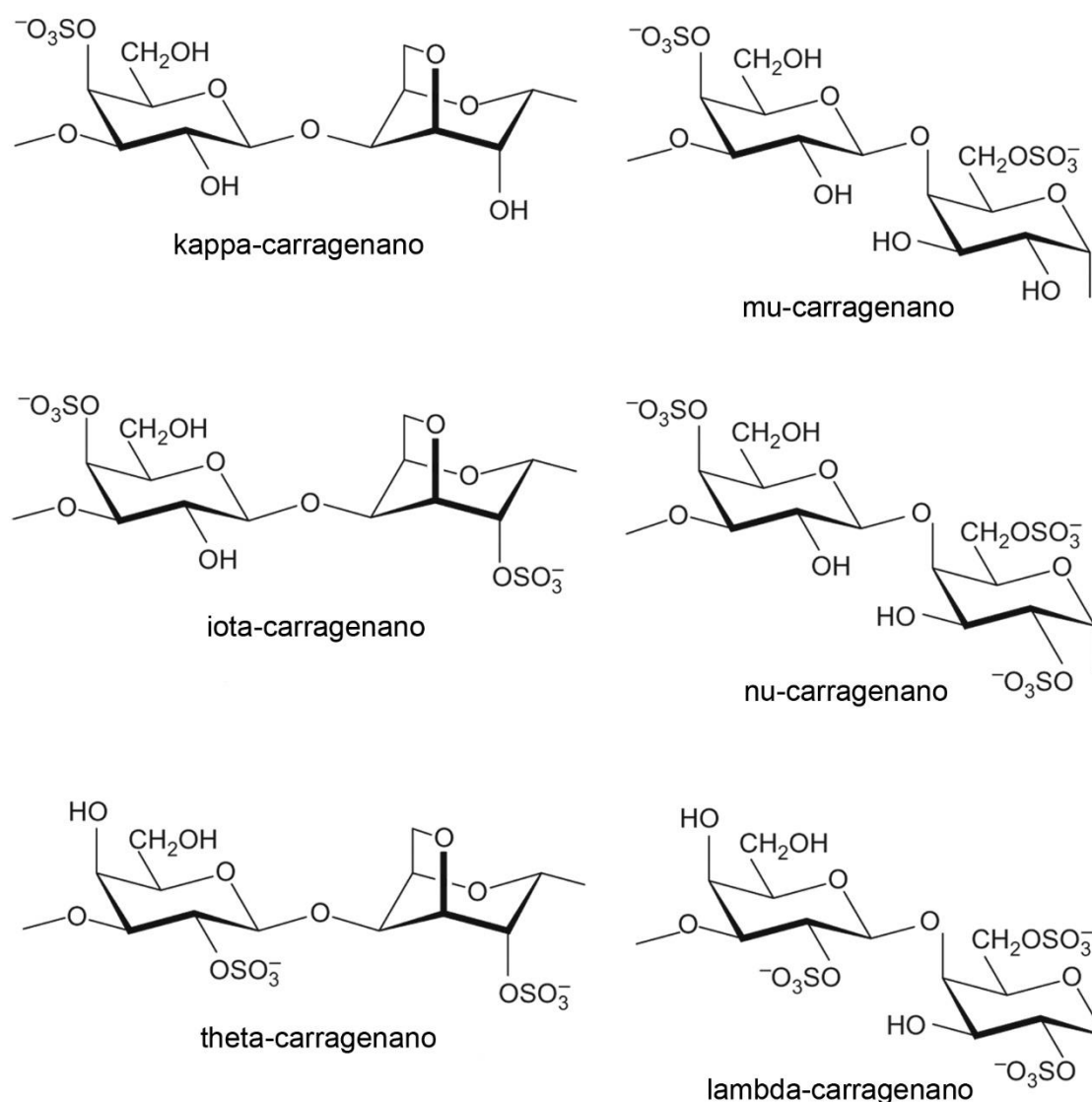


Fig. 5.1. Unidades diméricas repetitivas de las formas básicas de carragenanos. (Adaptado de Usov 2011)

En los últimos años, ha habido un interés creciente en la obtención de modificaciones químicas de estos polisacáridos (Prado y Matulewicz 2014; Barahona et al. 2015), así como también en lograr interacciones de los mismos con otros polímeros naturales o sintéticos (Prado et al. 2008, 2009; Khan et al. 2017), con el fin de lograr propiedades novedosas o mejorar las existentes, lo que sin duda implica agregar valor al producto natural.

Polisacáridos naturales como la pectina, el alginato, el quitosano y, como se mencionó anteriormente, el carragenano, pueden ser usados para encapsular un compuesto bioactivo con el fin de lograr su liberación de manera controlada (Leong et al. 2011). En sistemas de liberación controlada de fármacos, el compuesto activo es

encapsulado en una red polimérica de manera que está protegido de la exposición al pH bajo y enzimas gástricas y, de este modo, el fármaco se libera gradualmente en las condiciones deseadas (Leong et al. 2011). Los carragenanos han sido utilizados exitosamente para encapsular algunos compuestos modelo (Sipahigil y Dortunc 2001; Gupta et al. 2001). Sin embargo, cuando se emplea solo carragenano como matriz, ocasionalmente no se obtienen los perfiles de liberación deseados, por lo que suelen usarse mezclas de polímeros (Li et al. 2014). Por otro lado, como el carragenano está cargado negativamente, puede asociarse con polímeros cargados positivamente para formar complejos interpolielectrolito (IPECs) con resultados prometedores en la liberación de ingredientes farmacéuticos activos (Prado et al. 2008; Bani-Jaber et al. 2011).

Los IPECs son una clase de complejo polimérico que se forma entre la mayoría de los polianiones y policationes por asociación iónica de unidades repetitivas de las cadenas poliméricas (Lowman 2000), y presentan numerosas ventajas para el diseño de sistemas de liberación de fármacos (Moustafine et al. 2009). Prado y colaboradores prepararon IPECs entre un κ -carragenano comercial y el copolímero Eudragit E PO® (Prado et al. 2008), así como también utilizando el polisacárido sulfatado extraído del alga roja *Polysiphonia nigrescens* (Prado et al. 2012), y los evaluaron en la liberación controlada de ibuprofeno.

Teniendo en cuenta que *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* son especies de algas rojas que habitan las costas argentinas y son consideradas altamente valiosas como materia prima para la producción de carragenanos, los **objetivos** del presente capítulo fueron:

1. Extraer y caracterizar los carragenanos de la generación gametofítica de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* obtenidas de una pradera en Cabo Raso, Chubut.
2. Obtener complejos interpolielectrolito con los carragenanos extraídos de cada especie y el copolímero Eudragit E PO®.
3. Evaluar el desempeño de los complejos interpolielectrolito preparados en la liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos utilizando ibuprofeno como fármaco modelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procesos de extracción, caracterización y modificación química de los carragenanos, de formación de IPECs y la liberación controlada de ibuprofeno se llevaron a cabo durante tres estadías en el laboratorio de la Dra. María Cristina Matulewicz, Departamento de Química Orgánica de la UBA, Centro de Investigación de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR, CONICET-UBA), y con la colaboración de los Dres. María Cecilia Rodríguez y Héctor Juan Prado.

2.1. EXTRACCIÓN

La extracción de los carragenanos de las generaciones gametofíticas de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* (GS y SC, respectivamente) se realizó de acuerdo a Matulewicz et al. (1989). Para cada especie, se molieron 50 g de talos cistocápicos (gametofitos femeninos) en un molinillo y posteriormente se colocaron en un balón de vidrio con 2 L de agua destilada a temperatura ambiente. La suspensión se agitó a 180 rpm durante 16 h con un agitador de paleta. Posteriormente, el residuo algal se separó por centrifugación (Sigma 4K15, Sigma Laboratory Centrifuges, rotor 12256) a 6000 rpm y 8 °C durante 15 minutos. El residuo se re-extrajo de la misma manera y el sobrenadante se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi R-205 operando a 54 rpm y a 40-50 °C. La solución resultante de la concentración del sobrenadante se volcó sobre tres volúmenes de isopropanol agitando con varilla de vidrio, procedimiento con el cual se logró la precipitación de las fibras de carragenano. Éste se secó en acetona bajo campana sobre papel absorbente a temperatura ambiente hasta la evaporación total del solvente y se liofilizó. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el carragenano de la segunda extracción.

El pellet (residuo algal) se liofilizó para calcular posteriormente el rendimiento de la extracción.

2.2. CARACTERIZACIÓN

Se determinó el contenido de hidratos de carbono totales, proteínas y ésteres sulfato de los productos liofilizados. Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis reductiva y acetilación para determinar la composición de monosacáridos. Se realizó la ciclación en medio alcalino de las unidades α -D-galactopiranososa-6-sulfato a unidades 3,6-anhidrogalactosa. Se determinó la configuración absoluta de las unidades 3,6-

anhidrogalactosa en el polímero. Se procedió a la determinación de la estructura del carragenano de *Sarcothalia crispata* mediante análisis estructural por metilación y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

2.2.1. Hidratos de carbono totales

La determinación del contenido de hidratos de carbono totales se realizó por el método fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956) sin hidrólisis previa del polisacárido.

Materiales:

- H₂SO₄ en grado analítico 98%.
- Solución de fenol al 5% en agua.

Curva estándar: se utilizó una solución madre de galactosa de 80 µg/mL.

Muestra: se prepararon soluciones de carragenano en agua bidestilada de 2 mg/mL para *G. skottsbergii* y 1,5 mg/mL para *S. crispata*. El contenido de hidratos de carbono totales se llevó a cabo sobre alícuotas de 20, 40 y 60 µL de solución de muestra.

Procedimiento:

Se colocó un volumen conocido de la solución a analizar conteniendo hasta 35 µg de azúcar en tubos de ensayo de vidrio. Se llevó a 500 µL con agua destilada. Se agregaron 0,5 mL de fenol al 5% en cada tubo. Se dejaron caer 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado en el centro del tubo, para asegurar un máximo calentamiento. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Jenway 6505 UV/Vis (Jenway, Dunmow, UK).

2.2.2. Proteínas

La determinación de proteínas se realizó según Lowry et al. (1951).

Materiales:

Se prepararon las siguientes soluciones:

- A) Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N.
- B) CuSO₄.5H₂O al 0,5% en solución de tartrato de sodio y potasio 1%.
- C) 50 mL de A + 1 mL de B (se preparó en el momento de usar).
- D) Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck), diluido a la mitad con agua destilada, inmediatamente antes de ser usado.

Curva estándar: se usó una solución madre de albúmina de suero bovino de 500 µg/mL.

Muestra: solución de carragenano de 2 mg/mL para *G. skottsbergii* y de 1,5 mg/mL para *S. crispata*. Se utilizaron alícuotas de 200 µL y 400 µL de cada muestra.

Procedimiento:

Se prepararon tubos con volumen conocido de la solución conteniendo hasta 200 µg de proteína y se los llevó a 400 µL con agua destilada. A cada tubo se agregaron 2 mL de solución C, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron 0,2 mL de solución D en vortex. Se esperaron 30 minutos antes de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 500 nm.

2.2.3. Sulfato

La determinación del contenido de ésteres sulfato se realizó mediante el método turbidimétrico de Dodgson y Price (1962).

Materiales:

- Reactivo de Cl_2Ba /gelatina: se disolvieron 100 mg de gelatina (OXOID, libre de sulfatos) en 20 mL de agua destilada y se llevó a baño de agua caliente (60-70 °C) para disolver. La solución resultante se dejó en heladera durante 6 h para gelatinizar. Luego se disolvieron 100 mg de Cl_2Ba en la gelatina viscosa y se dejó en heladera durante al menos 2-3 h.

- TCA (ácido tricloroacético) 3%: se agregaron 15 g de TCA a 500 mL de agua destilada. La solución se conservó en heladera.

- HCl 1M (blanco)

Curva estándar: se usó una solución madre de Na_2SO_4 en HCl 1M (se pesaron 5,92 mg de Na_2SO_4 y se disolvieron en 10 mL de HCl 1M).

Muestra: se disolvieron 2 mg de carragenano en 1 mL de HCl 1M. Se llevó a estufa a 105-110 °C por 4-5 h en un vial con tapa de teflón para la hidrólisis de las muestras. Luego se dejó enfriar y se mezcló antes de usar. Las mediciones en las muestras se hicieron en alícuotas de 100, 150 y 200 µL de muestra.

Procedimiento:

Los tubos con los volúmenes correspondientes se llevaron a 400 µL con HCl 1M. Se agregaron 2,8 mL de TCA 3% y se mezcló. Se añadieron 800 µL de solución de

Cl₂Ba/gelatina y se mezcló. Se dejó a temperatura ambiente por 15-20 minutos y se leyó la absorbancia a 360 nm.

2.2.4. Monosacáridos constituyentes

2.2.4.1. Hidrólisis reductiva

Para la determinación de los azúcares componentes, se prepararon los alditoles peracetilados por la técnica de hidrólisis reductiva de Furneaux para galactanos sulfatados (Stevenson y Furneaux 1991). Este método es el único que permite la derivatización correcta de la 3,6-anhidrogalactosa que es lábil en medio ácido fuerte.

HIDRÓLISIS ÁCIDA REDUCTIVA

Materiales:

- Solución acuosa de 4-metilmorfolina borano (MMB) 80 mg/mL. Se preparó en el momento de usar. Para disolver el MMB se calentó la solución brevemente a 50 °C.

- Ácido trifluoroacético (TFA) 3 M

- TFA puro

Procedimiento:

Se colocaron 2 mg de muestra en un vial con tapa de Teflon al que se agregaron 100 µL de MMB y 400 µL de TFA 3M. Se llevó a 80 °C durante 10 minutos en estufa. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 100 µL de MMB. Se llevó a 120 °C por 120 minutos en una plancha calefactora (Pierce Reacti-Therm Heating/Stirring Module). Se dejó enfriar y se agregaron 100 µL de MMB. Se llevó a sequedad con aire bajo campana calentando sobre manta calefactora a 50 °C.

PREPARACIÓN DE LOS ALDITOLES PERACETILADOS

Luego se agregaron 200 µL de TFA puro y 200 µL de anhídrido acético bajo campana (acetilación en medio ácido). Se llevó 10 minutos a 50 °C en estufa. Se procedió a extraer los alditoles acetilados con cloroformo:agua, lavando con solución saturada de bicarbonato de sodio y luego con agua, y finalmente secando sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtró la muestra y se secó con corriente de aire. Se conservó la muestra a -20 °C para luego analizarla con cromatografía gas-líquido (CGL).

Se obtuvieron alditos peracetilados de monosacáridos conocidos a fin de utilizarlos como estándares.

2.2.4.2. Determinación de la configuración absoluta de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa

Se siguió el procedimiento descrito por Navarro y Stortz (2003) que consiste en una técnica de doble hidrólisis-doble aminación reductiva.

Materiales:

- Solución A: solución 1:8 (v/v) de (S)- α -metilbencilamina en metanol.
- Solución B: solución 1:4 (v/v) de ácido acético glacial en metanol.
- Solución C: solución de cianoborohidruro de sodio en metanol al 3% (p/v).

Procedimiento:

A 1 mg de muestra se agregaron 0,25 mL de TFA 0.1 M y se llevó a 80 °C durante 3 h para hidrolizar. Luego se evaporó el solvente adicionando agua (0,5 mL 3 veces) y llevando a sequedad para eliminar trazas de ácido. A continuación, se agregaron consecutivamente 32 μ L de la solución A, 17 μ L de la solución B y 13 μ L de la solución C. El vial tapado se llevó a 65 °C durante 1-2 h. Posteriormente, bajo campana se agregaron cuatro gotas de TFA 3 M hasta alcanzar pH 1-2 para destruir el exceso de cianoborohidruro de sodio. La mezcla se evaporó y coevaporó con agua destilada (3 x 0,5 mL) y metanol (5 x 0,5 mL) y se mantuvo en desecador de vacío durante una noche. Luego se hidrolizó con TFA 2 M a 120 °C por 90 minutos, al cabo de los cuales se arrastró el ácido llevando a seco con lavados sucesivos de agua. Se repitió la aminación reductiva con metilbencilamina como en la primera etapa. Los aminodesoxialditos obtenidos se llevaron a seco y se mantuvieron una noche en desecador. Finalmente se peracetilaron con piridina:anhídrido acético (1:1) a 100 °C durante 45 minutos. Se dejó enfriar y los derivados se extrajeron con cloroformo y lavados con agua destilada (3 x 0,5 mL) y solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 0,5 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a CGL.

2.2.5. Tratamiento alcalino

In vivo, la formación de 3,6-anhidrogalactosa ocurre enzimáticamente a partir del precursor α -galactosa 6 sulfato (Genicot-Joncour et al. 2009). Esta misma transformación puede reproducirse *in vitro* mediante tratamiento alcalino (Navarro y Stortz 2003). Por diferencia con el polisacárido nativo se puede estimar la proporción de unidades

precursoras α -galactosa 6-sulfato presentes en el mismo por la diferencia entre la 3,6-anhidrogallactosa presente en el mismo y en el polisacárido tratado con álcali.

Procedimiento:

En un vial se disolvieron 2 mg de muestra en 0,2 mL de agua con el agregado de 1 mg de NaBH_4 para impedir la degradación a partir del extremo reductor. Se continuó con el agregado de 0,1 mL de NaOH 3 M y calentamiento a 80 °C durante 3 h en plancha calefactora. Se dejó enfriar y se neutralizó con 0,12 mL de TFA 3 M. Luego se agregó resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120 $[\text{H}^+]$), se separó la resina por filtración y se evaporó el solvente. A continuación, se obtuvieron los alditos peracetilados por la técnica de hidrólisis reductiva de Furneaux mencionada anteriormente para el análisis por CGL.

2.2.6. Análisis estructural por metilación

La metilación de SC se llevó a cabo sobre su sal de trietilamonio (Stevenson y Furneaux 1991) según el método de Ciucanu y Kerek (1984).

OBTENCIÓN DE LA SAL DE TRIETILAMONIO

Se utilizaron 20 mg de SC. Se armó una columna de vidrio con un lecho de resina Amberlite IR-120 (H^+). La resina se equilibró con clorhidrato de trietilamonio al 5%, lavando posteriormente con agua destilada hasta obtener reacción negativa para cloruros con nitrato de plata.

La sal de trietilamonio de SC se recuperó por elución con agua y posterior liofilización.

METILACIÓN

La sal de trietilemanonio de SC se disolvió en 0,5 mL de dimetilsulfóxido anhidro agitando en vial cerrado. Luego se agregaron aproximadamente 100 mg de hidróxido de sodio pulverizado, continuando con la agitación durante media hora. El vial se colocó en baño de agua-hielo y se añadieron 0,5 mL de yoduro de metilo. La agitación prosiguió durante 30 minutos. La reacción se cortó agregando agua destilada. El contenido del vial se trasvasó a una bolsa de diálisis Spectra-Por® con un diámetro de poro de 3.500 Dalton. Se dializó exhaustivamente primero contra agua corriente (48 h) y luego contra agua destilada (24 h). Finalmente se liofilizó el polisacárido metilado, obteniendo 15 mg de producto. El producto permetilado se sometió a hidrólisis reductiva y peracetilación para el análisis por cromatografía gas-líquido.

2.2.7. Cromatografía gas-líquido (CGL)

Se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se usó nitrógeno como gas portador y una relación split de 80:1.

2.2.7.1. Análisis de los alditoles peracetilados

Para separación y análisis de los monosacáridos de los polisacáridos (como alditoles peracetilados) se utilizó una columna capilar SP2330 WCOT (0,25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud) recubierta con una película de 0,20 µm de espesor de film. Se empleó una presión de cabeza de 15 psi y un flujo de gas portador de 1-1,3 mL/min. Las corridas se realizaron isotérmicamente a 220°C, con inyector y detector a 240°C.

2.2.7.2. Análisis de los alditoles permetilados

Para separación y análisis de los monosacáridos del polisacárido metilado (como alditoles permetilados) se utilizó la columna capilar SP2330 descrita más arriba operando con un programa de temperatura de 160 a 210 °C a 2 °C / min seguida por una rampa desde 210 a 240 °C a 5 °C / min.

2.2.7.3. Análisis de los 1-amino-1-desoxialditoles

Los productos provenientes de derivatización por aminación reductiva se analizaron en una columna Hewlett-Packard Ultra 2 (Hewlett-Packard) (0,36 mm de diámetro interno y 50 m de longitud), con 0,17 mm de espesor de film. Se utilizó una presión de cabeza de 11 psi y flujo de gas portador de 0.8 mL/min. Para las corridas se usó un programa de temperatura con una primera rampa desde 180 a 220 °C a 4 °C/min y una segunda desde 220 a 270 °C a 1 °C/min. La temperatura del inyector y del detector se fijó a 270 °C.

En caso de ser necesario las asignaciones de los picos del cromatograma gaseoso se corroboraron por análisis en CGL acoplada a espectrometría de masa.

2.2.8. Métodos espectroscópicos

2.2.8.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se disolvieron 5 mg de carragenano en 1 mL de agua bidestilada en un vial. Se colocó esta solución en una superficie de teflón. Se llevó a desecador a fin de obtener la formación

del film. Los espectros infrarrojos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro FT-IR Thermo Scientific Nicolet IS50, equipado con accesorio ATR, a 4000-500 cm⁻¹. Se realizaron 100 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹. Las señales se asignaron según Matsuhira (1996) y Pereira et al. (2011).

2.2.8.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de ¹H- se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Avance II 500 a temperatura ambiente. La muestra (20 mg en 0,4 mL de D₂O) se colocó en un tubo de 5 mm. Se utilizaron los siguientes parámetros: un tiempo de adquisición de 4,4 s, un ángulo de pulso de 30°, un retardo de pulso de 1 s, un ancho espectral de 7,50 kHz, y entre 16 y 50 barridos.

Adicionalmente, se empleó una técnica bidimensional de correlación C-H (HSQC) a temperatura ambiente, utilizando una frecuencia de 500 MHz para el espectro de ¹H y de 125 MHz para el de ¹³C.

Las resonancias se asignaron de acuerdo a Ciancia et al. (1993) y Pérez Recalde et al. (2016).

2.3. COMPLEJOS INTERPOLIELECTROLITO (IPECs)

2.3.1. Formación de IPECs

Se prepararon IPECs entre GS y SC, y el copolímero de metacrilato básico butilado, comercializado como Eudragit E PO® (EE). Para el cálculo de las concentraciones de polisacáridos a utilizar, se determinó el porcentaje de diadas presentes en cada polímero a partir del área de las señales anoméricas en el espectro de ¹H-RMN. Estos porcentajes junto con el peso molecular de la diada ideal (408 para el κ-carragenano, 510 para el ι-carragenano, 528 para el μ-carragenano y 630 para el ν-carragenano permitieron determinar la Unidad Repetitiva Equivalente (URE) según la siguiente ecuación:

$$ERU = \frac{\kappa_{diad\%} \times 408 + \iota_{diad\%} \times 510 + \mu_{diad\%} \times 528 + \nu_{diad\%} \times 630}{\kappa_{diad\%} \times 1 + \iota_{diad\%} \times 2 + \mu_{diad\%} \times 2 + \nu_{diad\%} \times 3}$$

En esta ecuación, el numerador indica la masa correspondiente a 100 unidades repetitivas del polisacárido, mientras que el denominador señala el número de cargas (grupos sulfato) presente en el mismo número de unidades repetitivas.

La URE del Eudragit E se calculó teniendo en cuenta la relación en el polímero 2:1:1 de los monómeros dimetilaminoetilmetacrilato, butilmetacrilato y metilmetacrilato dispuestos al azar en la cadena del polímero, según especificaciones del fabricante.

El cálculo de la URE resultó de 288 y 308 Da para SC y GS y de 278 Da para EE.

En base a este cálculo, se prepararon soluciones de SC (985 mg), GS (1042 mg) y EE (945 mg) en 500 mL de buffer acetato 0,05 M (pH 5.0) por separado, a fin de iniciar la reacción con el mismo número de equivalentes (cargas) para los reactivos (EE y los dos carragenanos). A continuación, las soluciones de GS y EE, y SC y EE se vertieron simultáneamente en un vaso de precipitado y se dejó en un agitador magnético durante 1 h a temperatura ambiente. Las mezclas EE-GS y EE-SC se dejaron reposar por 1 h y luego se centrifugaron a 9000 rpm. Se repitió el lavado de los precipitados con agua tres veces, separando por centrifugación entre cada lavado. Finalmente se liofilizaron.

Para confirmar la interacción de cada componente en el IPEC se llevó a cabo el análisis elemental.

2.3.2. Liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos

2.3.2.1. Preparación de comprimidos

Se utilizó ibuprofeno como fármaco modelo. Para evaluar la liberación de ibuprofeno se prepararon comprimidos con 100 mg de IPEC y 50 mg de ibuprofeno mezclados manualmente (150 ± 1 mg). Para evaluar el hinchamiento y erosión de los IPECs se prepararon comprimidos con 100 ± 1 mg de IPEC. La compresión se realizó en una prensa hidráulica. Los comprimidos resultantes tuvieron un diámetro de $7 \pm 0,1$ mm.

2.3.2.2. Hinchamiento y erosión

Se calculó el grado de hinchamiento de los comprimidos luego de 8 h ($S\%_{8h}$) en buffer fosfato 0.05 M a pH 7.2 y a una temperatura de 37°C mediante la siguiente ecuación:

$$S\%_{8h} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100$$

donde m_1 es el peso inicial del comprimido seco y m_2 el peso final del comprimido luego de 8 h de liberación de droga. Los resultados son la media de tres mediciones.

El grado de erosión de los IPECs luego de 8 h ($E\%_{8h}$) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$E\%_{8h} = \frac{m_1 - m_3}{m_1} \times 100$$

donde m_1 es el peso inicial del comprimido seco y m_3 el peso del comprimido luego de 8 h del test de liberación de droga y luego liofilizado. Los resultados corresponden a la media de tres mediciones.

2.3.2.3. Liberación de ibuprofeno

La liberación de ibuprofeno de los comprimidos de EE-GS y EE-SC se evaluó utilizando un disolutor estándar que cumple con los requerimientos USP para el aparato tipo I (canastillo) (Avic Industrial, Buenos Aires, Argentina). Se usó una velocidad de rotación de 100 rpm y una temperatura de 37 °C. El medio de disolución consistió en 1000 mL de buffer fosfato 0,05 M a pH 7,2, y se realizó el ensayo durante 8 h. Se tomaron alícuotas de 3 mL de solución cada 30 minutos sin reemplazo de volumen (se hicieron correcciones en el volumen total para calcular las concentraciones). La cantidad de ibuprofeno liberado se determinó leyendo la absorbancia a 221 nm en un espectrofotómetro (Cary 1E, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) por triplicado. Ensayos previos determinaron que estos polímeros no interfieren con la determinación de fármaco modelo.

Los ensayos de liberación del ingrediente farmacéutico activo se ajustaron a una regresión no lineal, aceptando el modelo para $R^2 \geq 0.998$.

Para ajustar los perfiles de liberación se usó el modelo de Peppas (Peppas 1985):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

donde, M_t/M_∞ es la fracción del ingrediente farmacéutico activo liberado en el tiempo t (horas), k es la constante de liberación aparente (horas^{-n}) relacionada con la geometría y estructura del sistema, y n es el exponente de liberación.

A su vez, para obtener una visión más detallada del mecanismo involucrado en la liberación del ingrediente farmacéutico activo, se aplicó el modelo de Peppas y Sahlin (Peppas y Sahlin 1989):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$$

donde, M_t/M_∞ es la fracción del ingrediente farmacéutico activo liberado en el tiempo t (horas), k_1 es la constante de difusión (horas^{-m}), k_2 es la constante de relajación (horas^{-2m}), y m es el exponente de difusión Fickiana para un sistema de cualquier forma geométrica. De esta manera, el primer término de la ecuación muestra la contribución de la difusión Fickiana a la liberación total de droga (F) y el segundo representa la relajación de la matriz (R), que está dada principalmente por hinchamiento y erosión.

La proporción de ambas contribuciones puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$\frac{R}{F} = \frac{k_2 t^m}{k_1}$$

2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Los carragenanos nativos de *G. skottsbergii* y *S. crispata*, el copolímero Eudragit E PO® y los IPECs EE-GS y EE-SC se metalizaron con una fina capa de oro en atmósfera de argón. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio LEO EVO 40XVP (CCT Bahía Blanca), equipado con pistola de emisión termoiónica y detector de electrones secundarios (SE). Se utilizó un voltaje de aceleración de 7 kV. Para estimar las áreas relativas de los poros de los IPECs se utilizó el software Digimizer 5.3.3. (Digimizer 2018).

3. RESULTADOS

3.1. RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

La extracción del carragenanos a partir de 50 g de talos gametofíticos de *Gigartina skottsbergii* y de *Sarcothalia crispata* dio como resultado 15 y 20,5 g de producto, respectivamente. El rendimiento y la composición de los carragenanos se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Rendimiento y composición de los extractos de *G. skottsbergii* y *S. crispata*. Los rendimientos se calcularon para 100 g de materia seca. Los datos corresponden a dos réplicas y se presentan como media \pm desvío estándar.

	Rendimiento ^a (%)	Carbohidratos (% anhidro)	Sulfato (% NaSO ₃)	Proteína (%)	Monosacáridos ^a (% molar)		Gal:AnGal:sulfato ^b (relación molar)
					D-Gal	D-AnGal	
GS	30 \pm 7	58 \pm 7	30 \pm 1.5	3,9 \pm 0,3	59 \pm 4	41 \pm 3	1,00:0,60:1,20
SC	41 \pm 0.3	72 \pm 0.1	37 \pm 1.2	2,4 \pm 0.7	74 \pm 5	26 \pm 5	1,00:0,39:1,12

^a GS contiene 5% de glucosa

^b Gal: galactosa; AnGal: anhidrogalactosa

Tanto para el polisacárido extraído de gametofitos de *S. crispata* como de *G. skottsbergii*, la configuración D- de la 3,6-anhidrogalactosa y galactosa concuerda con un carragenano como producto principal (Tabla 5.1). Luego del tratamiento alcalino se obtuvo aumento del contenido de 3,6-anhidrogalactosa, resultando en una proporción molar 1:1 de galactosa:3,6-anhidrogalactosa. Esto indica la presencia de sulfato en la posición C-6 de la unidad enlazada en la posición 4-.

Los resultados del análisis estructural por metilación del carragenano de *S. crispata* (Tabla 5.2) son consistentes con un carragenano de la familia k. Es decir, una cadena esquelética de unidades de galactosa unida en posición 3- (2,6-di-O-metilgalactosa, 51%), 3,6-anhidrogalactosa unida en posición 4- (3,6-anhidro-2-O-metilgalactosa, 27%) y 3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato (3,6-anhidrogalactosa, 9%). Nótese que estos porcentajes molares resultan en una relación D-gal: D-AnGal 1,4:1, mayor a la de la Tabla 5.1. Ello indica que ocurrió una ciclación de las unidades precursoras galactosa 6-sulfato y galactosa 2,6-disulfato unidas en posición 4- en el medio alcalino de la alquilación. La presencia de 3-/4-O-metilgalactosa (7%) puede interpretarse como derivada de los residuos de galactosa 2,6-disulfato, teniendo en cuenta las señales del espectro de ^1H -RMN del polisacárido nativo.

Tabla 5.2. Composición (% molar) de monosacáridos producidos por permetilación e hidrólisis del carragenano de *S. crispata*.

Monosacárido	Unidad estructural ^a	% molar ^b
2,4,6-Me ₃ Gal	G	3 ± 1
2,3,6-Me ₃ Gal	D	1 ± 0,1
2-Me AnGal	DA	27 ± 2
D-AnGal	DA2S	9 ± 0,5
2,6-Me ₂ D-Gal	G4S	51 ± 3
2-Me Gal	G4S,6S o D3S,6S	2 ± 0,3
3-Me Gal	D2S,6S	7 ± 2

^a Nomenclatura según Knutsen et al. (1994).

^b Los valores representan la media ± desvío estándar y están basados en dos réplicas.

Los espectros de FT-IR de GS y SC fueron similares (Fig. 5.2.a, b), presentaron bandas a 1240 cm⁻¹ (sulfato), 926-7 cm⁻¹ (3,6-anhidrogalactosa), 844-5 cm⁻¹ (sulfato en C-4 de la galactosa unida en posición 3-), y una pequeña banda en 803-5 cm⁻¹ (sulfato en C-2 de la 3,6-anhidrogalactosa). Las señales en 830 cm⁻¹ (sulfato en C-2) y 820 cm⁻¹ (sulfato en C-6 de la galactosa unida en posición 3-) se superpusieron con el pico ancho en 845 cm⁻¹ (Matsuhira 1996; Pereira et al. 2011).

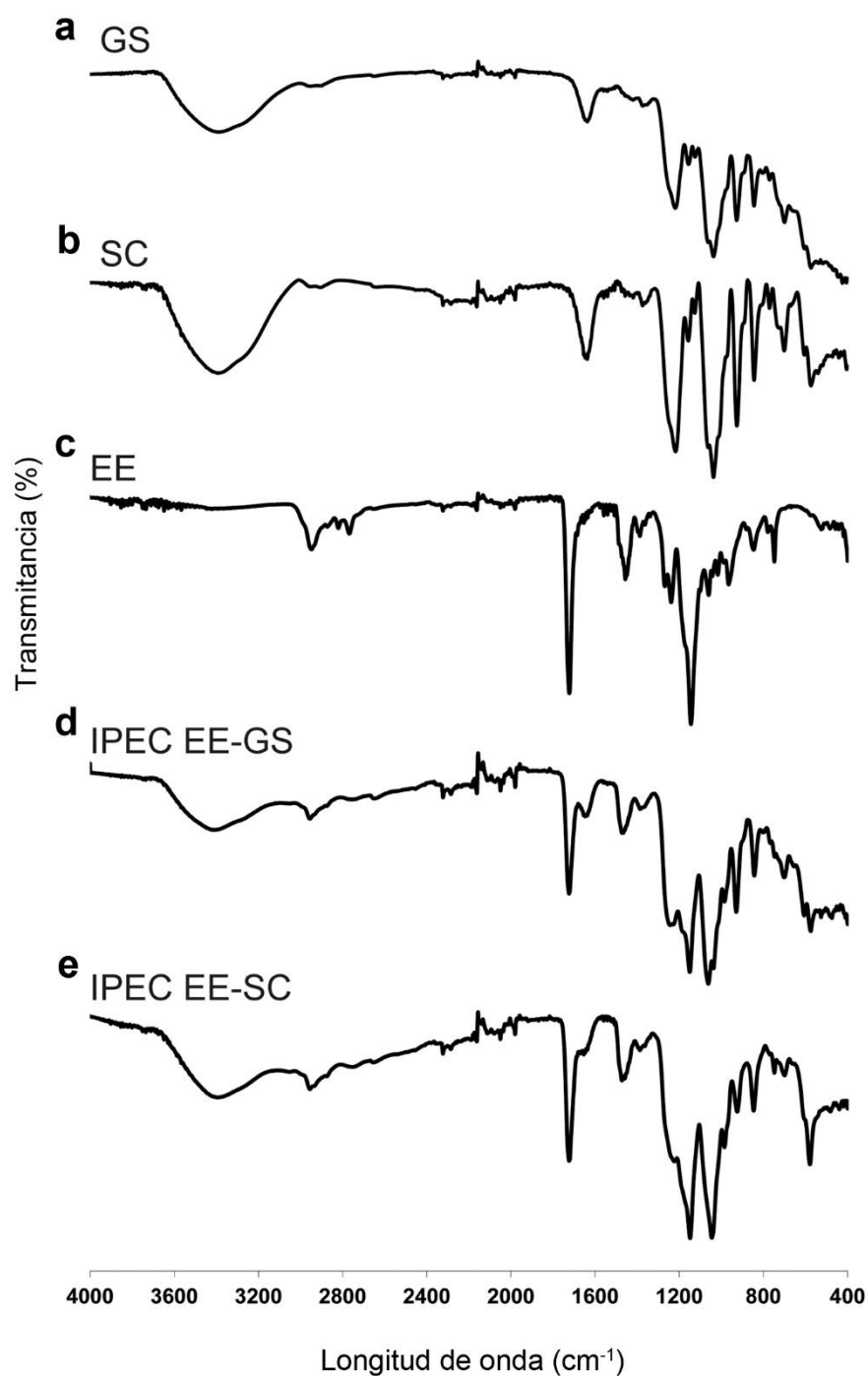


Fig. 5.2. Espectros FT-IR de **(a)** carragenano de *G. skottsbergii*, **(b)** carragenano de *S. crispata*, **(c)** Eudragit E, **(d)** IPEC EE-GS y **(e)** IPEC EE-SC.

La Tabla 5.3. muestra las asignaciones del espectro $^1\text{H-NMR}$ junto con el cálculo de las áreas de los protones anoméricos de las unidades α unidas a la β -D-galactosa 4-sulfato para los polisacáridos de GS y SC. En los dos casos, el espectro $^1\text{H-NMR}$ indicó que el

producto consistía de una mezcla de carragenanos de tipo κ /I- y v-. El área más importante correspondió a la resonancia del protón anomérico de la 3,6-anhidrogalactosa, indicando el predominio de la díada κ - (70% en SC y 56 % en GS) y cantidades menores pero significativas de las díadas I- (12% en SC y 20% en GS) y v- (18 % en SC y 24% en GS).

Tabla 5.3. Asignaciones del espectro $^1\text{H-NMR}$ (ppm) de las señales anoméricas de las unidades α -D-galactosa unidas a β -D-galactosa 4-sulfato para los carragenanos de *G. skottsbergii* y *S. crispata*.

Carragenano	Señal	Unidad α	Area (%)
<i>G. skottsbergii</i>			
	5,50	D2S,6S	9
	5,27	DA2S	6
	5,09	DA	35
<i>S. crispata</i>			
	5,50	D2S,6S	12
	5,27	DA2S	10
	5,09	DA	28

Nomenclatura según Knutsen et al. (1994).

El análisis estructural de los carragenanos se completó con los espectros de HSQC (Figura 5.3.a, b) en los que se pudieron asignar todas las resonancias para las díadas deducidas por metilación y $^1\text{H-NMR}$ (Tablas 5.4. y 5.5.)

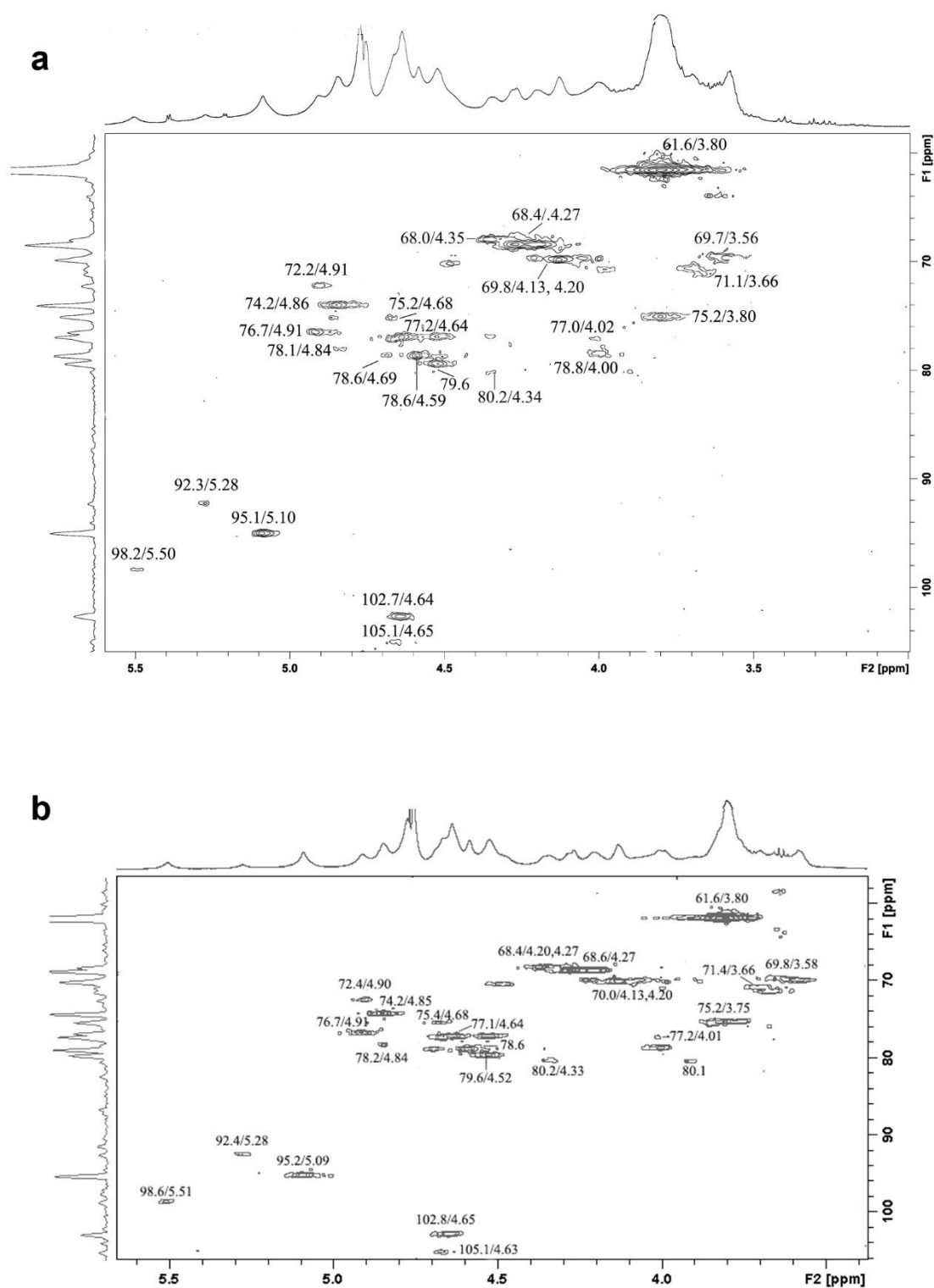


Figura 5.3. Espectros HSQC de los carragenanos de **(a)** *G. skottsbergii* y **(b)** *S. crispata*.

Tabla 5.4. Asignaciones de señales (ppm) de HSQC del carragenano de *G. skottsbergii*.

Unidad estructural ^a	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H6,6'
<i>díada κ</i>						
G4S	102,7/4,64	69,7 /3,56	79,6	74,2/4,86	75,1/3,80	61,6/3,80
DA	95,1/5,10	69,8/4,13	79,6/4,52	78,6/4,59	77,2/4,64	69,5/4,20; 4,27
<i>díada ι</i>						
G4S	102,7/4,64	69,7/3,56	77,0/4,02	72,2/4,91	75,2/3,80	61,6/3,80
DA2S	92,3/5,28	75,2/4,68	78,1/4,84	78,6/4,69	77,2/4,64	68,8/4,13; 4,20
<i>díada ν</i>						
G4S	105,1/4,65	71,1/3,66	80,2	71,1/3,66	75,1/3,80	61,6/3,80
D2S,6S	98,2 /5,50	76,7/4,91	68,4/4,27	8,,2/4,36	68,4/4,27	68,0/4,35

^a Nomenclatura según Knutsen et al. (1994).

Tabla 5.5. Asignaciones de señales (ppm) de HSQC del carragenano de *S. crispata*.

Unidad estructural ^a	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H6,6'
<i>díada κ</i>						
G4S	102,8/4,65	69,8/3,58	79,6	74,2/4,85	75,2/3,75	61,6/3,80
DA	95,2/5,09	70,0/4,13	79,6/4,52	78,6/4,59	77,1/4,64	70,0/4,13; 4,20
<i>díada ι</i>						
G4S	102,8/4,65	69,8/3,58	77,2/4,01	72,4/4,90	75,2/3,75	61,6/3,80
DA2S	92,4/5,28	75,4/4,68	78,2/4,84	78,6	77,1/4,61	70,0/4,13; 4,20
<i>díada ν</i>						
G4S	105,1/4,63	71,4/3,66	80,1	71,4/3,66	75,2/3,75	61,6/3,80
D2S,6S	98,6/5,51	76,7/4,91	68,6/4,27	80,3/4,33	68,6/4,20	68,6/4,20; 4,27

^a Nomenclatura según Knutsen et al. (1994).

3.2. COMPLEJOS INTERPOLIELECTROLITO (IPECs)

3.2.1. Formación de IPECs

La relación molar N:S obtenida por análisis elemental de los IPECs fue de 1,00:0,96 para EE-GS y 1,00:0,98 para EE-SC, señalando la formación de IPECs estequiométricos.

La formación de la sal de amonio en los IPECs se confirmó por la desaparición de las dos bandas a 2768 y 2819 cm^{-1} del espectro FT-IR de EE (Fig. 5.2.c), ausentes tanto en los espectros de GS (Fig. 5.2.a) como de SC (Fig. 5.2.b), y despreciables en los correspondientes IPECs (Fig. 5.2.d, e).

3.2.2. Liberación de ibuprofeno

3.2.2.1. Hinchamiento y erosión de los comprimidos

Los comprimidos con IPEC EE-GS presentaron, luego de 8 h, un grado de hinchamiento de 240% y de erosión de 28%, mientras que los que contenían IPEC EE-SC presentaron un hinchamiento de 223% y una erosión de 23%.

3.2.2.2. Liberación de ibuprofeno

La liberación de ibuprofeno fue mayor para el IPEC EE-GS (35% luego de 8 h) que para el IPEC EE-SC (20% luego de 8 h) (Fig. 5.4).

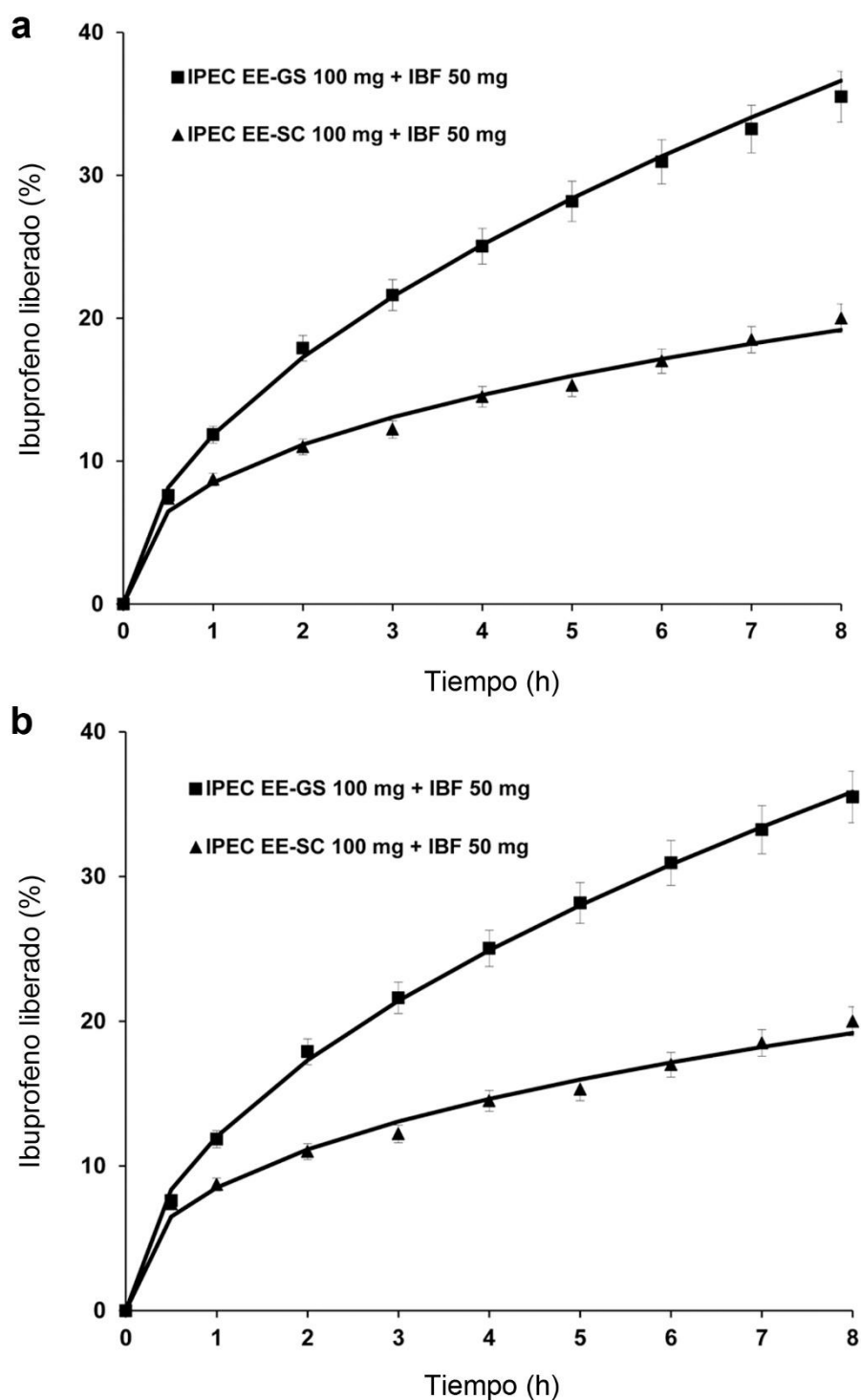


Fig. 5.4. Perfiles de liberación de ibuprofeno a partir de los IPECs EE-GS y EE-SC. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas los datos esperados según los modelos de **(a)** Peppas y **(b)** Peppas y Sahlin. Los datos representan la media \pm desvío estándar para $n = 3$.

En la Figura 5.5 puede verse que la contribución de la difusión Fickiana sobrepasa la relajación de la matriz en ambos IPECs, siendo la contribución relativa de la primera ligeramente menor en el IPEC EE-GS que en el IPEC EE-SC. La contribución relativa de la relajación aumenta a medida que avanza el tiempo de liberación para ambos IPECs.

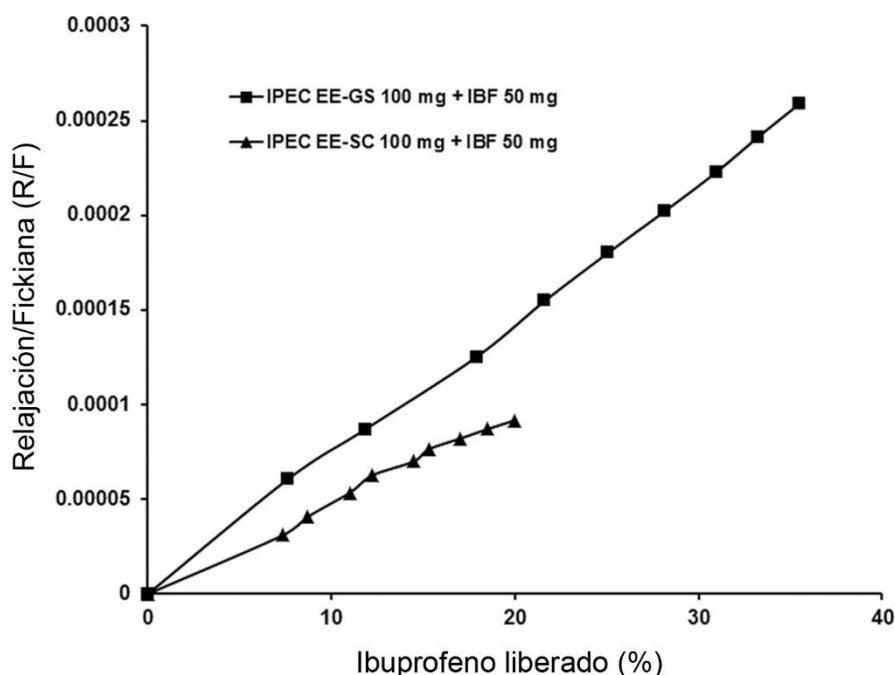


Fig. 5.5. Tasa de contribución de la relajación y difusión Fickiana a la liberación de ibuprofeno de los IPECs EE-GS y EE-SC.

3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las micrografías electrónicas de barrido de GS mostraron fibras agrupadas en haces (Fig. 5.6.a) mientras que SC presentó una estructura laminar con una superficie lisa y numerosas perforaciones circulares de distintos tamaños (Fig. 5.6.b). El copolímero EE presentó partículas de tamaño más o menos heterogéneo y forma irregular (Fig. 5.6.c). A baja magnificación, la superficie del IPEC EE-GS mostró una apariencia particulada heterogénea (5.6.d), mientras que el IPEC EE-SC presentó una superficie particulada homogénea (5.6.e). Con mayor magnificación, ambos IPECs mostraron una estructura de apariencia esponjosa, con cavidades irregulares ($0,41 \pm 0,04 \mu\text{m}$ de largo por $0,19 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de ancho) en el IPEC EE-GS (Fig. 5.6.f) y con poros regulares en el IPEC EE-SC ($0,12 \pm 0,01 \mu\text{m}$ de diámetro) con una distribución uniforme (Fig. 5.6.g).

El IPEC EE-GS presentó $5 \pm 0,4$ poros / μm^2 , y el $11,7 \pm 0,6\%$ de la superficie estuvo cubierta por poros. Por otro lado, el IPEC EE-SC tuvo $9,06 \pm 0,2$ poros / μm^2 y los mismos representaron el $6,4 \pm 0,3\%$ del área total del IPEC.

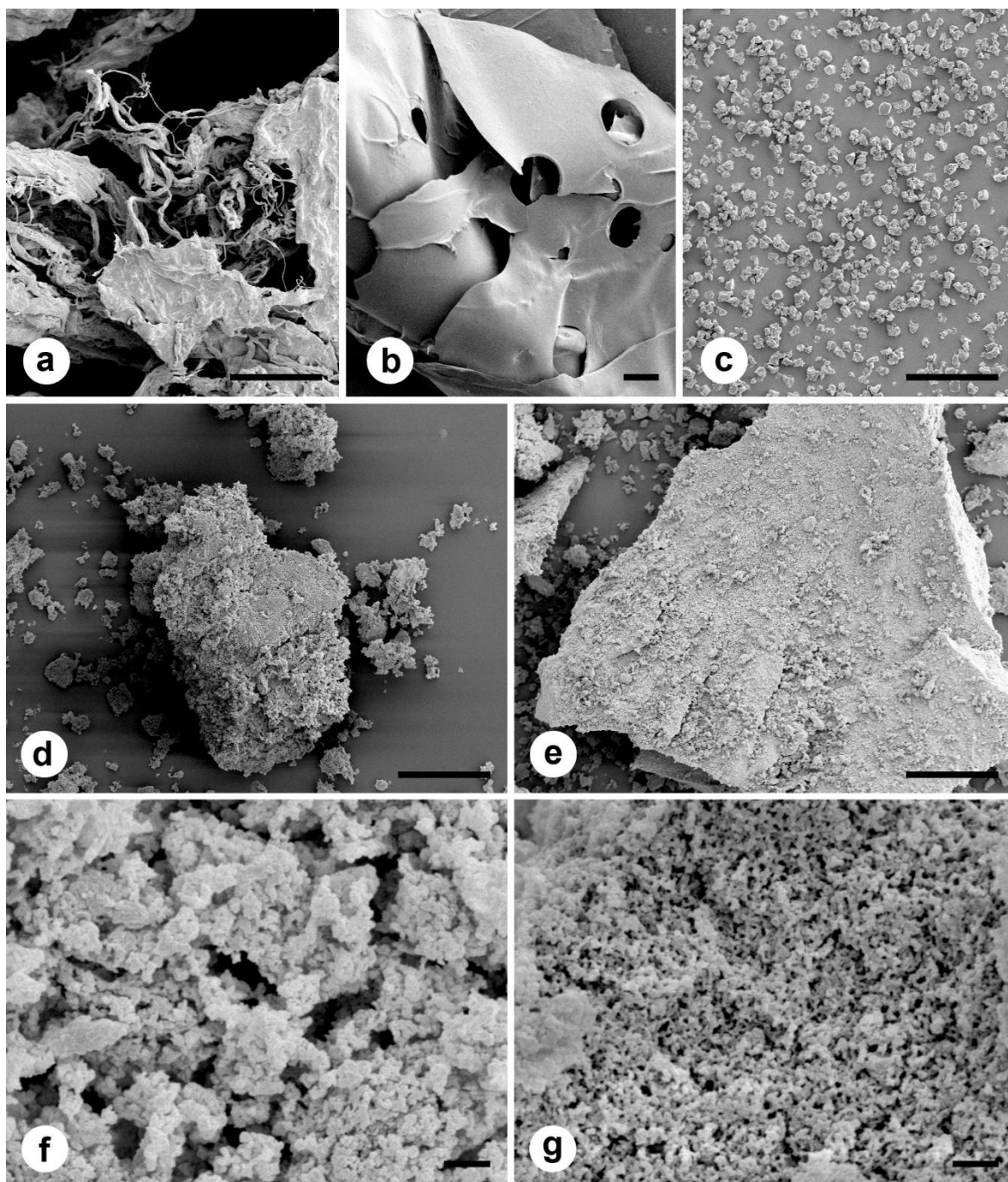


Fig. 5.7. Micrografías electrónicas de barrido de (a) carragenano nativo de *G. skottsbergii*, (b) carragenano nativo de *S. crispata*, (c) copolímero Eudragit E, (d, f) IPEC EE-GS, (e, g) IPEC EE-SC. Barras escala: a, b, c, d, e = 100 μm , f, g = 1 μm .

4. DISCUSIÓN

Los polisacáridos de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* tienen composiciones de díadas similares, pero no iguales, siendo principalmente carragenanos tipo κ - pero también encontrándose cantidades menores, pero significativas, de díadas ι - y ν -. El aumento del contenido de 3,6-anidrogactosa luego del tratamiento alcalino indica la presencia de grupos sulfato sobre el C-6 de la unidad enlazada en posición 4-. Estas unidades precursoras pueden ciclarse *in vitro* por tratamiento alcalino o *in vivo* en la vía biosintética. En el polisacárido, las unidades galactosa 6-sulfato o 2,6-disulfato actúan como horquillas en la cadena del polímero, ya que la conformación silla 4C_1 introduce una irregularidad en la cadena que impide la formación de la hélice (Rees et al. 1982), y cuya distribución tiene incidencia en las propiedades gelificantes del polímero. De esta manera, la molécula de carragenano tiene regiones de secuencias regulares con la capacidad de formar dobles hélices con la misma u otra molécula, separadas por zonas que interrumpen este ordenamiento, lo que resulta en una estructura tridimensional transformando la solución en un gel (Cerezo 1992). Estas zonas irregulares también están implicadas en la distribución de las formas y tamaños de los poros y canales del gel, involucrados en los fenómenos de transporte y propiedades mecánicas (Cerezo 1992).

Las características del carragenano de la generación gametofítica de *G. skottsbergii* fueron ligeramente diferentes al estudiado previamente por Matulewicz y colaboradores (1989), el cual consistió en cantidades similares de carragenanos gelificantes y solubles de los tipos κ -/ ι - y μ -/ ν -, respectivamente. Esto puede deberse a que los μ - y ν -carragenanos son precursores bioquímicos de los κ - e ι -carragenanos (Usov 2011). A su vez, se ha propuesto para otras carragenófitas que las propiedades físicas de los carragenanos y la composición química del talo pueden variar de acuerdo a condiciones ambientales (Durako y Dawes 1980; Reis et al. 2008). La población estudiada por Matulewicz et al. (1989) se encuentra localizada en Bahía Camarones (44,7 S, 65,67 O), un ambiente protegido donde las comunidades de algas están menos expuestas al oleaje que en Cabo Raso, sitio de colección de los ejemplares estudiados en esta tesis. Por lo tanto, se podría inferir que una mayor cantidad de carragenanos gelificantes conferiría ventajas a la población sometida a fricción mecánica por el oleaje en cabo Raso. Sin embargo, Garbary et al. (2011) han indicado que se requieren estudios a largo plazo de la incidencia del movimiento del agua sobre la composición de los carragenanos para tener una visión clara de la aclimatación fisiológica de los individuos a las condiciones ambientales.

El porcentaje de díadas reportado en este estudio para el carragenano de la generación gametofítica de *S. crispata* es similar al reportado por Jouanneau et al. (2011) para el carragenano obtenido por extracción acuosa de *S. crispata* de Chile, en el cual la κ -carrabiosa fue la unidad principal (51%), al igual que en el presente estudio. Sin embargo, la ι -carrabiosa (27%) y ν -carrabiosa (17%) se encontraron en cantidades levemente mayores y menores, respectivamente, y también se detectaron pequeñas cantidades de μ -carrabiosa (5%). Por otro lado, Falshaw et al. (2001) reportaron la composición de díadas del carragenano de *S. crispata* colectada en Chile, pero extraída con 0,1 M Ca(OH)_2 , o con 0,02 M NaOH, a 95 °C, condiciones diferentes a las utilizadas en este estudio. A pesar de que estas condiciones de extracción producen ciclación total o parcial de las unidades precursoras, la suma de los porcentajes de κ -carrabiosa y de su precursor (μ -carrabiosa) fue de 62%, y la suma de los porcentajes de ι -carrabiosa y de su precursor (ν -carrabiosa) fue 32%, levemente distintas de los porcentajes obtenidos en este estudio (56% para κ -carrabiosa y 44% para ι/ν -carrabiosa).

Los IPECs EE-GS y EE-SC observados con MEB mostraron características morfológicas y estructurales particulares, así como también en cuanto a su comportamiento en la liberación de ibuprofeno. Esto puede deberse a la composición de díadas y a la manera en que las mismas se distribuyen en la cadena del polisacárido, ya que afectarían la forma, tamaño y área relativa de los poros de los IPECs. El IPEC EE-SC, con poros más pequeños y de forma más regular que el IPEC EE-GS, mostró valores de liberación de ibuprofeno menores. Estas características de los poros del IPEC EE-SC observadas con MEB, podrían deberse a una distribución más uniforme de la secuencia de díadas.

Los resultados obtenidos sugieren que la estructura del hidrogel se forma rápidamente, impidiendo de esta manera la liberación instantánea de una importante cantidad de fármaco (Huang y Brazel 2001).

Prado et al. (2008) reportaron la preparación, caracterización y comportamiento en la liberación de ibuprofeno de un IPEC estequiométrico formado por Eudragit E y un κ -carragenano comercial. La liberación de ibuprofeno se evaluó en condiciones idénticas a las usadas en el presente estudio, y se obtuvieron valores finales de liberación similares a los del IPEC EE-GS. Esto podría deberse al mayor contenido de 3,6-anhidrogalactosa de GS en comparación con SC, más cercano al contenido del κ -carragenano comercial.

SÍNTESIS Y CONCLUSIONES

En la presente tesis se estudiaron aspectos reproductivos y de cultivo *in vitro* de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata*, dos macroalgas rojas carragenófitas de la Patagonia argentina, de gran importancia económica. A su vez, se realizaron estudios de la estructura de los carragenanos extraídos a partir de los gametofitos de estas especies y de la elaboración de complejos interpolielectrolito (IPECs) para su evaluación en la liberación controlada de ingredientes farmacéuticamente activos.

Nuestro país presenta una gran diversidad de recursos algales marinos, aunque muchos de ellos han sido escasamente o nada estudiados. Las especies de macroalgas en las que se centra esta tesis han sido explotadas desde hace décadas por una empresa privada a partir de arribazones en la costa del sur de Argentina, si bien en la actualidad su utilización ha disminuido considerablemente. En la costa pacífica de Sudamérica estas especies también son cosechadas para la industria de hidrocoloides y, ante problemas como la sobreexplotación, se han desarrollado técnicas de cultivo, con mayor o menor éxito, a partir de fragmentos de frondes o de esporas (Correa et al. 1999; Westermeier et al. 1999). Resulta imprescindible el conocimiento exhaustivo de los recursos algales de nuestra costa para optimizar su producción e impulsar un desarrollo sustentable.

En este trabajo se determinó la disponibilidad de esporas de *Gigartina skottsbergii* y se iniciaron cultivos en laboratorio para estimar la fijación y supervivencia de las mismas sobre distintos sustratos. Tanto las carpósporas como las tetrásporas presentaron una limitada disponibilidad a lo largo del año, restringiéndose a los meses de invierno y primavera. Las carpósporas y tetrásporas se liberaron espontáneamente en grandes cantidades a partir de las frondes cistocárpicas y tetraspóricas de *G. skottsbergii*, sin la necesidad de aplicar algún método de inducción (dsecación, shock osmótico). A su vez, la temperatura no parecería ser un factor que afecte a la liberación de esporas cuando se aplica durante la incubación de las frondes fértiles. Por otro lado, el aumento de horas de luz tendría un efecto positivo en la liberación de tetrásporas, no ocurriendo lo mismo en la liberación de carpósporas.

En *Sarcothalia crispata* tampoco se observó una mayor liberación de carpósporas o tetrásporas con la aplicación de distintos métodos de inducción (dsecación, shock osmótico, baja temperatura), por lo que la liberación espontánea sería adecuada para la obtención de ambos tipos de esporas.

Estudios realizados en poblaciones de *G. skottsbergii* y *S. crispata* han determinado una dominancia gametofítica en el hábitat natural (Hannach y Santelices 1985; Piriz et al. 1996; Zamorano y Westermeier 1996). En el presente trabajo resulta interesante que en ambas especies se encontró una mayor liberación de esporas por cm² de fronde para los tetrasporofitos. Esta información es relevante a la hora de iniciar esporocultivos específicos

para la cosecha de biomasa gametofítica o tetraspórica por separado. De esta manera se lograrían extraer carragenanos con propiedades diferentes a partir de la misma especie, pudiendo así mejorar la calidad del producto industrial.

Gigartina skottsbergii presentó una muy baja supervivencia en cultivos *in vitro* a partir de esporas sobre diferentes sustratos (vidrio, mejillones, conchillas, piedras), obteniéndose una baja germinación y, consecuentemente, escasas plántulas en estadios juveniles. Por su parte, las carpósporas y tetrásporas de *Sarcothalia crispata* se fijaron, germinaron y desarrollaron plántulas sobre los cuatro sustratos evaluados (vidrio, sogas, conchillas, piedras), obteniéndose las mayores densidades y buen crecimiento sobre conchillas y piedras. Las sogas no tuvieron buenos resultados, con bajas densidades finales y reducido crecimiento de plántulas.

Este es el primer estudio sobre aspectos reproductivos de *Sarcothalia crispata* de la Patagonia argentina. Además, es el primer estudio en el que se analiza la disponibilidad de esporas de una población de *Gigartina skottsbergii* de la costa Atlántica de Sudamérica y se desarrollan cultivos en laboratorio a partir de las mismas. Es importante resaltar que el conocimiento exhaustivo de liberación de esporas y desarrollo de plántulas gametofíticas y tetraspóricas constituyen la base para iniciar esporocultivos a mayor escala.

Los resultados obtenidos aportan información valiosa para el manejo de praderas de *G. skottsbergii*, quedando todavía la necesidad de realizar nuevas experiencias de cultivo *in vitro* antes de iniciar ensayos piloto de esporocultivos, de manera de optimizar las condiciones para maximizar la supervivencia y crecimiento de las plántulas. *Sarcothalia crispata* mostró un buen desarrollo en cultivos *in vitro* sobre sustratos naturales, algo interesante ya que, en el país, es una especie solo cosechada ocasionalmente junto a *G. skottsbergii*. De acuerdo a los resultados obtenidos, la posibilidad de implementar esporocultivos piloto de *S. crispata* se presenta con mayor factibilidad que en el caso de *G. skottsbergii*.

Los carragenanos extraídos de gametofitos de *G. skottsbergii* y *S. crispata* presentaron una composición de díadas similar, aunque no idéntica, siendo éstas principalmente κ -, pero también habiendo un contenido bajo pero significativo de díadas ι - y ν -. Los IPECs formados por cada carragenano y el copolímero Eudragit E mostraron características particulares, tanto en su composición química como a nivel ultraestructural, lo cual se vio reflejado en una liberación más lenta de ibuprofeno en el IPEC formado por el carragenano de *S. crispata*. La liberación controlada de ingredientes farmacéuticos activos constituye una aplicación novedosa de los carragenanos de estas dos especies nativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alveal K, Romo H, Werlinger C (1995) Cultivo de *Gracilaria* a partir de esporas. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (eds) Manual de Métodos Ficológicos, 1ra edn. Universidad de Concepción, Concepción, pp 599-609
- Asensi A (1981) Programas de investigación sobre el recurso de las algas marinas bentónicas del litoral patagónico. Unesco, Paris, 20 pp
- Avila M, Ask E, Rudolph B, Nuñez M, Norambuena R (1999a) Economic feasibility of *Sarcothalia* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivation. *Hydrobiologia* 398/399: 435-442
- Avila M, Candia A, Núñez M, Romo H (1999b) Reproductive biology of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta) from Chile. *Hydrobiologia* 398/399: 149-157
- Avila M, Godoy C, Rodríguez D (2012) Manual para la repoblación de algas: desde la extracción hacia la agronomía marina. Resultados y lecciones. Serie Programa Educativo Participativo para la Pesca Artesanal. I La repoblación de lugas. Universidad Arturo Prat, 70 pp.
- Avila M, Núñez M, Candia A, Norambuena R (1997) Patrones fenológicos reproductivos de una población de *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta), en Ancud, Chile. *Gayana Oceanol* 5(1): 21-32
- Avila M, Otaíza R, Norambuena R, Nuñez M (1996) Biological basis for the management of 'luga negra' (*Sarcothalia crispata*, Gigartinales, Rhodophyta) in southern Chile. *Hydrobiologia* 326/327: 245-252
- Avila M, Piel MI, Alcapan A (2014) Indoor and outdoor culture of *Callophyllis variegata* (Bory) Kützinger (Gigartinales, Rhodophyta) in southern Chile. *J Appl Phycol* 26: 769-774
- Avila M, Piel MI, Caceres JH, Alveal K (2011) Cultivation of the red alga *Chondracanthus chamissoi*: sexual reproduction and seedling production in culture under controlled conditions. *J Appl Phycol* 23: 529-536
- Azanza RV, Aliaza TT (1999) In vitro carpospore release and germination in *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty from Tawi-Tawi, Philippines. *Bot Mar* 42: 281-284
- Bani-Jaber A, Al-Aani L, Alkhatib H, Al-Khalidi B (2011) Prolonged intragastric drug delivery mediated by Eudragit® E-carrageenan polyelectrolyte matrix tablets. *AAPS PharmSciTech* 12(1): 354-361
- Barahona T, Prado HJ, Bonelli PR, Cukierman AL, Fissore EL, Gerschenson LN, Matulewicz MC (2015) Cationization of kappa- and iota-carrageenan. Characterization and properties of amphoteric polysaccharides. *Carbohydr Polym* 126: 70-77

- Barsanti L, Gualtieri P (2006) *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton
- Bixler HJ, Johndro K, Falshaw R (2001) Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloid* 15: 619-630
- Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol* 23: 321-335
- Boraso de Zaixso A (2013) *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*. EDUPA, Comodoro Rivadavia
- Boraso de Zaixso A, Ciancia M, Cerezo AS (1998) The seaweed resources of Argentina. En: Critchley AT, Ohno M (eds) *Seaweed resources of the world*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp 372-384
- Boraso de Zaixso AL, Ciancia M, Cerezo AS, Piriz ML, Casas GN, Eyra MC (2015) Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides. En: Zaixso HE, Boraso A (eds). *La zona costera patagónica argentina, volumen 1: Recursos biológicos bentónicos*, pp 3-60
- Boraso de Zaixso AL, Quartino ML (1993) Estudios sobre algas marinas bentónicas en Argentina. *Naturalia patagónica* 1: 35-57
- Bulboa C, Macchiavello J, Véliz K, Oliveira EC (2010) Germination rate and sporelings development of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) varies along a latitudinal gradient on the coast of Chile. *Aquat Bot* 92: 137-141
- Buschmann AH, Camus C, Infante J, Neori A, Israel A, Hernández-González MC, Pereda SV, Gomez-Pinchetti JL, Golberg A, Tadmor-Shalev N, Critchley AT (2017) Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *Eur J Phycol* 52(4): 391-406
- Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R (1999) Recent advances in the understanding of the biological basis for *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta) cultivation in Chile. *Hydrobiologia* 398/399: 427-434
- Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R, Hernández-González MC, Norambuena R (2001a) Red algal farming: a review. *Aquaculture* 194: 203-220

- Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R, Paredes MA, Aedo D, Potin P, Aroca G, Hernández-González MC (2001b) Cultivation of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta): recent advances and challenges for the future. *J Appl Phycol* 13: 255-266
- Buschmann AH, Hernández-González MC, Varela D (2008) Seaweed future cultivation in Chile: perspectives and challenges. *Int J Environ Pollut* 33(4): 432-456
- Buschmann AH, Stead RA, Hernández-González MC, Pereda SV, Paredes JE, Maldonado MA (2013) Un análisis crítico sobre el uso de macroalgas como base para una acuicultura sustentable. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 251-264
- Buschmann AH, Varela D, Cifuentes M, Hernandez Gonzalez MC, Henriquez L, Westermeier R, Correa JA (2004) Experimental indoor cultivation of the carrageenophytic red alga *Gigartina skottsbergii*. *Aquaculture* 241: 357–370
- Campo VL, Kawano DF, da Silva DB Jr, Carvalho I (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydr Polym* 77: 167–180
- Candia A, Nuñez M (2013) Protocolo de cultivo de luga negra y luga roja. Proyecto HUAM-FONDEF AQ 08/1031. Instituto de Fomento Pesquero, 14 pp
- Candia A, Nuñez M (2017) Manual de Técnicas de repoblación y cultivo de “luga negra” (*Sarcothalia crispata*). Proyecto HUAM-FONDEF AQ 08/1031. Instituto de Fomento Pesquero, 35 pp
- Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Damonte EB, Cerezo AS (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int J Biol Macromol* 20: 97-105
- Carvalho LG, Pereira L (2015) Review of marine algae as source of bioactive metabolites: a marine biotechnology approach. In: Pereira L (ed). *Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp 195-227
- Casas GN, Piriz ML (1993) Cultivo de *Gracilaria verrucosa* en Golfo Nuevo (Argentina). Experiencias preliminares. Libro de resúmenes del III Congreso Latinoamericano, 1ra Reunión Iberoamericana y I Congreso Mexicano de Ficología. Palacio de Minería, México DF, pp 107
- Cerezo AS (1992) Hidrocoloides. *Ciencia e Investigación* 45(1): 6-19
- Ciancia M, Matulewicz MC, Cerezo AS (1997) A L-galactose-containing carrageenan from cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry*, 45(5): 1009-1013

- Ciancia M, Matulewicz MC, Finch P y Cerezo AS (1993) Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 238: 241-248
- Ciucanu I, Kerek F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 131(2): 209-217
- Correa JA, Beltrán J, Buschmann AH, Westermeier R (1999) Healing and regeneration responses in *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales): optimization of vegetative propagation for cultivation. *J Appl Phycol* 11: 315–327
- Craigie JS (1990) Cell walls. En: Cole KM, Sheath RG (eds) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 221-257
- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004) Sulfated Seaweed Polysaccharides as Antiviral Agents. *Curr Med Chem* 11: 2399-2419
- Delaney A, Frangoudes K, Li SA (2016). *Society and Seaweed: Understanding the Past and Present*. En: Fleurence J, Levine I (eds) *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier Academic Press, London, pp 7-40
- Digimizer (2018). Digimizer: Image Analysis Software Version 5.3.3. MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium. URL <https://www.digimizer.com/>
- Dillehay TD, Ramirez C, Pino M, Collins MB, Rossen J, Pino-Navarro JD (2008) Monte Verde: Seaweed, Food, Medicine, and the Peopling of South America. *Science* 320: 784–786.
- Dodgson KS, Price RG (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84: 106-110
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350–356
- Durako MJ, Dawes CJ (1980) A comparative seasonal study of two populations of *Hypnea musciformis* from the East and West Coasts of Florida, USA. I. Growth and chemistry. *Mar Biol* 59: 151-156
- Falshaw R, Bixler HJ, Johndro K (2001) Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts 1. Structure analysis. *Food Hydrocolloid* 15: 441-452
- FAO (2013) Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming. Roma, FAO, pp 204
- FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma, FAO, pp 190

- Faugeron S, Martínez EA, Correa JA, Cardenas L, Destombe C, Valero M (2004) Reduced genetic diversity and increased population differentiation in peripheral and overharvested populations of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) in southern Chile. *J Phycol* 40: 454-462
- Fletcher RL, Callow ME (1992) The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Brit Phycol J* 27(3): 303-329
- Flores ML, Cerezo AS, Stortz CA (2000a) Alkali treatment of the polysaccharides from the cystocarpic stage from *Iridaea undulosa*. *Molecules* 5: 541–542
- Flores ML, Stortz CA, Cerezo AS (2000b) Studies on the skeletal cell wall of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* B. Part I. Fractionation of the cell wall and methylation analysis of the inner core-fibrillar polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 27: 21–27
- Flores ML, Stortz CA, Rodríguez MC, Cerezo AS (1997) Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. *Bot Mar* 40: 411-419
- Garbary DJ, De Wreede RE (1988) Life history phases in natural populations of Gigartinaceae (Rhodophyta): quantification using resorcinol. In: Lobban S, Chapman DJ, Kremer BP (eds) *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 174-178
- Garbary DJ, Tompkins E, White K, Corey P, Kim JK (2011) Temporal and spatial variation in the distribution of life history phases of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Algae* 26: 61-71
- Genicot-Joncour S, Poinas A, Richard O, Potin P, Rudoph B, Kloareg B, Helbert W (2009) The cyclization of the 3,6-anhydro-galactose ring of ι-carrageenan is catalyzed by two D-galactose-2,6-sulfurylases in the red alga *Chondrus crispus*. *Plant Physiol* 151: 1609-1616
- Glenn EP, Moore D, Fitzsimmons K, Azevedo C (1996) Spore culture of the edible red seaweed, *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta). *Aquaculture* 142: 59–74
- Gonzalez-Zuñiga M (2004) Efecto de la radiación UVB en el crecimiento de discos, microtalos y plántulas de *Sarcothalia crispata* (Bory) Leister en condiciones de laboratorio. Tesis de Grado, Universidad Austral de Chile, pp 83
- Graham LE, Wilcox LW (2000) Red Algae. En: Graham LE, Wilcox LW (eds) *Algae*, pp 343-396
- Guiry MD (2012) How many species of algae are there? *J Phycol* 48: 1057-1063

- Gupta VK, Hariharan M, Wheatley TA, Price JC (2001) Controlled-release tablets from carrageenans: effect of formulation, storage and dissolution factors. *Eur J Pharm Biopharm* 51: 241-248
- Hafting JT, Craigie JS, Stengel DB, Loureiro RR, Buschmann AH, Yarish C, Edwards MD, Critchley AT (2015) Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. *J Phycol* 51: 821-837
- Hannach G, Santelices B (1985) Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of *Iridaea* (Rhodophyta: Gigartinales). *Mar Ecol Prog Ser* 22: 291–303
- Hansen JE (1980) Physiological considerations in the mariculture of red algae. En: Abbott IA, Foster MS, Ekund LF (eds) *Pacific Seaweed Aquaculture*. University of California, La Jolla, pp 80-91
- Hayashi L, Bulboa C, Kradolfer P, Soriano G, Robledo D (2014) Cultivation of red seaweeds: a Latin American perspective. *J Appl Phycol* 26: 719-727
- Hernández-González MC, Buschmann AH, Cifuentes M, Correa JA, Westermeier R (2007) Vegetative propagation of the carrageenaphytic red alga *Gigartina skottsbergii* Setchell et Gardner: indoor and field experiments. *Aquaculture* 262: 120–128
- Hommersand MH, Guiry MD, Fredericq S, Leister GL (1993) New perspectives in the taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 260/261: 105-120
- Hommersand MH, Moe RL, Amsler CD, Fredericq S (2009) Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-Antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. *Bot Mar* 52: 509-534
- Huang X, Brazel CS (2001) On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Control Release* 73: 121-136
- Hughes MH, Michetti KM, Leonardi PI (2014) Settlement of *Gracilaria gracilis* carpospores (Gracilariales, Rhodophyta) on natural substrates from the southwestern Atlantic coast (Chubut, Argentina). *Bot Mar* 57: 131–137
- Infante RE, Candia AP (1988) Cultivation of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Iridaea ciliata* Kützinger (Rhodophyta, Gigartinaceae), “in vitro”: induced shedding and carpospores colonization on different substrates. *Gayana Bot* 45(1-4): 297-304
- Jouanneau D, Boulenguer P, Mazoyer J, Helbert W (2011) Hybridity of carrageenans water- and alkali-extracted from *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula*. *J Appl Phycol* 23: 105-114

- Khan AK, Saba AU, Nawazish S, Akhtar F, Rashid R, Mir S, Nasir B, Iqbal F, Afzal F, Pervaiz F, Murtaza G (2017) Carrageenan based bionanocomposites as drug delivery tool with special emphasis on the influence of ferromagnetic nanoparticles. *Oxidative Med Cell Longev*. 1–13
- Kim DH (1976) A study of the development of cystocarps and tetrasporangial sori in Gigartinaceae, (Rhodophyta, Gigartinales). *Nova Hedwigia* 27: 1-146
- Kim JK, Yarish C, Hwang EK, Park M, Kim Y (2017) Seaweed aquaculture: cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *Algae* 32(1): 1-13
- Knutsen SH, Myslabodski DE, Larsen B, Usov AI (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot Mar* 37: 163–169
- Lee RE (2008) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 547
- Leonardi PI, Miravalles AB, Faugeron S, Flores V, Beltran J, Correa JA (2006) Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in northern Chile. *Eur J Phycol* 41: 247-257
- Leong KH, Chung LY, Noordin MI, Mohamad K, Nishikawa M, Onuki Y, Morishita M, Takayama K (2011) Carboxymethylation of κ -carrageenan for intestinal-targeted delivery of bioactive macromolecules. *Carbohydr Polym* 83: 1507-1515
- Lewin J (1966) Silicon metabolism in diatoms V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6: 1-12
- Li L, Ni R, Shao Y, Mao S (2014) Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym* 103: 1-11
- Lowman AM (2000) Complexing polymers in drug delivery. En: Wise DL (ed) *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker, New York, pp 89–98
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Mansilla A, Palacios M, Aguilar S (2004) Efecto de la salinidad en el desarrollo inicial de *Sarcothalia crispata* (Bory) Leister (Rhodophyta, Gigartinales) bajo condiciones de laboratorio. *An Inst Patagon* 32: 13-233
- Mansilla A, Palacios M, Navarro NP, Avila M (2008) Growth and survival performance of the gametophyte of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) under defined nutrient conditions in laboratory culture. *J Appl Phycol* 20: 889-896

- Mansilla A, Werlinger C, Palacios M, Navarro NP, Cuadra P (2006) Effects of UVB radiation on the initial stages of growth of *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* and *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). J Appl Phycol 18: 451-459
- Marambio J, Mansilla A, Avila M, Rosenfeld S (2014) The effects of different light intensities on the culture of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) tetrasporophytes and gametophytes in the Magellan region, Chile. J Appl Phycol 26(5): 1963-1969
- Marin SL, Westermeier R, Melipillán J (2002) Simulation of alternative management strategies for red algae, luga roja, (*Gigartina skottsbergii* Setchell and Gardner) in southern Chile. Ecol Model 154: 121-133
- Matsuhiro B (1996) Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. Hydrobiologia 326: 481-489
- Matulewicz MC, Cerezo AS (1980) The carrageenan from *Iridaea undulosa* B.; analysis, fractionation and alkaline treatment. J Sci Food Agric 31: 203-213
- Matulewicz MC, Ciancia M, Nosedá MD, Cerezo AS (1989) Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. Phytochemistry 28(11): 2937-2941
- McHugh DJ (1991) Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. Hydrobiologia 221: 19-29
- McHugh DJ (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper No 441. Roma, Italia
- Michetti KM, Martín LA, Leonardi PI (2013) Carpospore release and sporeling development in *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from the southwestern Atlantic coast (Chubut, Argentina). J Appl Phycol 25: 1917-1924
- Moustafine RI, Salachova AR, Frolova ES, Kemenova VA, Van den Mooter G (2009) Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® E PO with sodium alginate as potential carriers for colonic drug delivery: monitoring of structural transformation and composition changes during swellability and release evaluating. Drug Dev Ind Pharm 35(12): 1439-1451
- Navarro DA, Stortz CA (2003) Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable α -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactans. Carbohydr Res 338: 211-218
- Otaíza RD, Abades SR, Brante AJ (2001) Seasonal changes in abundance and shifts in dominance of life history stages of the carrageenophyte *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) in south-central Chile. J Appl Phycol 13: 161-171

- Otaíza RD, Cáceres J (2015) Manual de una técnica para el repoblamiento de la luga negra, *Sarcothalia crispata* (Bory) Leister (Rhodophyta, Gigartinales), en praderas naturales, Región del Biobío. Proyecto FONDEF-HUAM AQ12I0004, pp 44
- Peppas NA (1985) Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 60: 100-111
- Peppas NA, Sahlin JJ (1989) A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm* 57: 169-172
- Pereira L, Amado AM, Critchley AT, van de Velde F, Ribeiro-Claro PJA (2011) Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FTRaman). *Food Hydrocolloid* 23: 1903–1909
- Pereira L, Ribeiro-Claro JA (2015) Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweeds with Potential Use in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries. En: Pereira L (ed) *Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp 228-250
- Pereira R, Yarish C (2008) Mass production of marine macroalgae. En: Jorgensen SE, Fath BD (eds) *Encyclopedia of ecology*, vol 3, Ecological engineering. Elsevier, Oxford, pp 2236-2247
- Pérez Recalde M, Canelón DJ, Compagnone RS, Matulewicz MC, Cerezo AS, Ciancia M (2016) Carrageenan and agar structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. *Carbohydr Polym* 136: 1370-1378
- Piriz ML (1996) Phenology of a *Gigartina skottsbergii* Setchell et Gardner Population in Chubut Province (Argentina). *Bot Mar* 39: 311-316
- Piriz ML, Casas GN (1996a) Panorama de estudio de los recursos algales en Argentina. En: Ferrario M, Sar E (eds) *Macroalgas de interés económico*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, pp 267-296
- Piriz ML, Casas G (1996b) Informe Técnico 26. Macroalgas de interés comercial en las costas del sur de Chubut y norte de Santa Cruz. Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. Fundación Patagónica Natural y Wildlife Conservation Internacional. ISSN N° 0328 - 462X.
- Piriz, ML, Cerezo, AS (1991) Seasonal variation of carrageenan in tetrasporic, cystocarpic and "sterile" stages of *Gigartina skottsbergii* S. et G. (Rhodophyta, Gigartinales). *Hydrobiologia* 225: 65-69

- Prado HJ, Matulewicz MC (2014) Cationization of polysaccharides; a path to greener derivatives with many industrial applications. *Eur Polym J* 52: 53–75
- Prado HJ, Matulewicz MC, Bonelli P, Cukierman AL (2008) Basic butylated methacrylate copolymer/kappa-carrageenan interpolyelectrolyte complex: preparation, characterization and drug release behaviour. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 171–178
- Prado HJ, Matulewicz MC, Bonelli P, Cukierman AL (2009) Preparation and characterization of a novel starch-based interpolyelectrolyte complex as matrix for controlled drug release. *Carbohydr Res* 344: 1325–1331
- Prado HJ, Matulewicz MC, Bonelli PR, Cukierman AL (2012) Preparation and characterization of controlled release matrices based on novel seaweed interpolyelectrolyte complexes. *Int J Pharm* 429: 12-21
- Prataprao Shere S (1985) Studies on sporulation and propagation in selected agarophytes. Tesis de Doctorado, University of Cochin, Cochin, pp 148
- Quartino ML, Zaixso HE, Boraso de Zaixso AL (2005). Biological and environmental characterization of marine macroalgal assemblages in Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Bot Mar* 48: 187-197
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Rebours C, Marinho-Soriano E, Zertuche-González JA, Hayashi L, Vásquez JA, Kradolfer P, Soriano G, Ugarte R, Abreu MH, Bay-Larsen I, Hovelsrud G, Rødven R, Robledo D (2014) Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. *J Appl Phycol* 26: 1939-1951
- Rees DA, Williamson FB, Frangou SA, Morris ER (1982) Fragmentation and modification of ι-carrageenan and characterisation of the polysaccharide order-disorder transition in solution. *Eur J Biochem* 122: 71-79
- Reis RP, Yoneshigue-Valentin Y, Pereira dos Santos C (2008) Spatial and temporal variation of *Hypnea musciformis* carrageenan (Rhodophyta–Gigartinales) from natural beds in Rio de Janeiro State, Brazil. *J Appl Phycol* 20: 1-8
- Rioux LE, Beaulieu L, Turgeon SL (2017) Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food Hydrocolloid* 68: 255-265

- Roleda MY, Zacher K, Wulf A, Hanelt D, Wiencke C (2008) Susceptibility of spores of different ploidy levels from Antarctic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) to ultraviolet radiation. *Phycologia* 47(4): 361-370
- Romo H, Alveal K (1995) Técnicas para el cultivo experimental, medición del crecimiento y manejo de las poblaciones de *Iridaea* (*Mazaella*). En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (eds) Manual de Métodos Ficológicos, 1ra edn. Universidad de Concepción, Concepción, pp 563–576
- Romo H, Alveal K, Werlinger C (2001) Growth of the commercial carrageenophyte *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales) on suspended culture in Central Chile. *J Appl Phycol* 13: 229-234
- Romo H, Avila M, Candia A (2004) Manual de técnicas de cultivo y repoblación de “Luga Roja” (*Gigartina skottsbergii*). Proyecto FONDEF D9711064 y D0011109. Universidad de Concepción-IFOP, Chile, 32pp
- Romo H, Avila M, Nuñez M, Perez R, Candia A, Aroca G (2006) Culture of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta) in southern Chile. A pilot scale approach. *J Appl Phycol* 18: 307–314
- Sahoo D, Yarish C (2005) Mariculture of seaweeds. En: Andersen RA (ed) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, New York, pp 219-237
- Santelices B (1990) Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28: 177–276
- Santelices B (1999) A conceptual framework for marine agronomy. *Hydrobiologia* 398/399: 15-23
- Santelices B, Correa JA, Aedo D, Flores V, Hormazábal M, Sánchez P (1999) Convergent biological processes in coalescing Rhodophyta. *J Phycol* 35: 1127–1149
- Santelices B, Correa JA, Hormazábal M, Flores V (2003) Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Mar Biol* 143: 381-392
- Santelices B, Martínez EA (1997) Hierarchical analysis of reproductive potential in *Mazzaella laminarioides* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 36(3): 195-207
- Scagel RF, Bandoni RJ, Maze JR, Rouse GE, Schofield WB, Stein J R (1991) Rodófitos (Algas rojas). En: Scagel RF, Bandoni RJ, Maze JR, Rouse GE, Schofield WB, Stein JR (eds) Plantas no vasculares. Ediciones Omega S A, Barcelona, 387-429 pp

- Scrosati RA (1991) Presencia de *Iridaea crispata* (Rhodophyta: Gigartinales) en Chubut y Santa Cruz, Argentina. Bol Soc Argent Bot 27: 1-2
- Sipahigil O, Dortunc B (2001). Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads. Int J Pharm 228: 119–128
- Soriano L (1980) Soriano S.A. En: Reunión Nacional sobre Recursos Marinos Costeros en Argentina. Puerto Madryn, Chubut, pp 93-102
- Stevenson TT, Furneaux RH (1991) Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. Carbohydr Res 210: 277–298
- Stortz CA, Bacon BE, Cherniak R, Cerezo AS (1994) High-field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. Carbohydr Res 261: 317-326
- Stortz CA, Cerezo AS (1986) The potassium chloride-soluble carrageenans of the red seaweed *Iridaea undulosa* B. Carbohydr Res 145: 219-235
- Stortz CA, Cerezo AS (1993) The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. Carbohydr Res 242: 217-227
- Stortz CA, Cerezo AS (2000) Novel findings in carrageenans, agaroids and hybrid^ red seaweed galactans. Curr Top Phytochem 4: 121–134
- Usov AI (2011) Polysaccharides of the Red Algae. Adv Carbohydr Chem Biochem 65: 115-217
- Vairappan CS, Chung CS, Hurtado AQ, Soya FE, Lhonneur GB, Critchley A (2007) Distribution and symptoms of epiphyte infection in major carrageenophyte-producing farms. En: Borowitzka MA, Critchley AT, Kraan S, Peters A, Sjøtun K, Notoya M (eds) Nineteenth International Seaweed Symposium. Developments in Applied Phycology, vol 2. Springer, Dordrecht, pp 27-33
- Werlinger C, Mansilla A, Villarroel A, Palacios M (2008) Effects of photon flux density and agricultural fertilizers on the development of *Sarcothalia crispata* tetraspores (Rhodophyta, Gigartinales) from the Strait of Magellan, Chile. J Appl Phycol 20: 757-76
- Westermeier R, Aguilar A, Sigel J, Quintanilla JC, Morales J (1999) Biological basis for the management of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) in southern Chile. Hydrobiologia 398/399: 137–147

- Westermeier R, Patiño DJ, Murúa P, Quintanilla JC, Correa J, Buschmann AH, Barros I (2012) A pilot-scale study of the vegetative propagation and suspended cultivation of the carrageenophyte alga *Gigartina skottsbergii* in southern Chile. J Appl Phycol 24: 11-20
- Zamorano, J. & R. Westermeier, 1996. Phenology of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) in Ancud Bay, southern Chile. Hydrobiologia 326/327: 253–258
- Zemke-White WL, Ohno M (1999) World seaweed utilisation: An end-of-century summary. J Appl Phycol 11: 369-376
- Zhou G, Sun Y, Xin H, Zhang Y, Li Z, Xu Z (2004) In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. Pharmacol Res 50: 47–53

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

A continuación, se listan las publicaciones y presentaciones en congresos realizadas en el marco de esta tesis doctoral.

Publicaciones en revistas internacionales con referato

Hughes, M.H.; Michetti, K.M. & Leonardi P.I. 2018. Spore release and germling development on different substrates in the carrageenophyte *Sarcothalia crispata* from the southwestern Atlantic coast. *Journal of Applied Phycology* DOI: 10.1007/s10811-018-1643-7. Netherlands. (ISSN 0921-8971).

Hughes, M. H.; Prado, H.; Rodríguez, M.C.; Michetti, K.; Leonardi, P.I. & Matulewicz, C. 2018. Carrageenans from *Sarcothalia crispata* and *Gigartina skottsbergii*: structural analysis and interpolyelectrolyte complex formation for drug controlled release. *Marine Biotechnology*. DOI: 10.1007/s10126-018-9842-4. Alemania. (ISSN: 1436-2228).

Presentaciones en congresos

Hughes, M.H.; Michetti, K.M. y Leonardi, P.I. 2015. Liberación *in vitro* de carpósporas y tetrásporas de *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *IX Jornadas de Ciencias del Mar*. Ushuaia.

Hughes, M.H.; Rodríguez, M.C.; Michetti, K.M.; Leonardi, P.I. y Matulewicz, M.C. 2015. Ensayos de cationización del carragenano de *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyceae) para su aplicación industrial. *IX Jornadas de Ciencias del Mar*. Ushuaia.

Hughes M. H.; Michetti K. y Leonardi P.I. 2017. Liberación *in vitro* de esporas de *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) del sur de Argentina durante un ciclo bianual. *X Congreso Chileno de Micro y Macroalgas*. Coquimbo, Chile.

Hughes M. H.; Prado H.; Rodríguez M.C.; Michetti K.; Leonardi P.I. y Matulewicz. 2017. Estructura del carragenano de *Sarcothalia crispata*: formación de un complejo interpolielectrolito carragenano-eudragit e y su aplicación en estudios de liberación controlada. *X Congreso Chileno de Micro y Macroalgas*. Coquimbo, Chile.

Hughes M.H.; Michetti K. & Leonardi P.I. 2018. Asentamiento y crecimiento *in vitro* de carpósporas y tetrásporas de *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta) sobre sustratos artificiales y naturales. *X Jornadas de Ciencias del Mar*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires.

Hughes M.H.; Michetti K. & Leonardi P.I. 2018. Evaluación de distintos métodos de inducción de la esporulación en el alga carragenófito *Sarcothalia crispata* (Gigartinales, Rhodophyta). *X Jornadas de Ciencias del Mar*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires.

ANEXO

Tabla 1. Densidad (cm⁻²) de carpósporas y tetrásporas de *Sarcothalia crispata* sobre distintos sustratos. Los valores representan la media \pm error estándar para n = 3.

Semana	Carpósporas				Tetrásporas			
	Vidrio	Sogas	Conchillas	Piedras	Vidrio	Sogas	Conchillas	Piedras
0	344,58 \pm 51,37	116,01 \pm 26,10	199,98 \pm 6,44	93,33 \pm 18,79	1.934,62 \pm 190,29	501,88 \pm 6,09	1.581,52 \pm 82,26	1.574,01 \pm 267,15
1	156,66 \pm 7,69	88,65 \pm 10,72	170,67 \pm 32,38	95,55 \pm 16,60	1.338,76 \pm 156,69	586,54 \pm 81,91	1.201,43 \pm 115,90	801,51 \pm 81,62
2	140,67 \pm 12,98	84,67 \pm 10,48	133,34 \pm 12,35	72,00 \pm 7,21	1.030,59 \pm 167,99	605,19 \pm 71,74	1.066,20 \pm 109,80	811,65 \pm 88,18
3	127,33 \pm 8,53	96,01 \pm 8,33	130,68 \pm 16,22	111,99 \pm 19,08	954,05 \pm 150,80	765,96 \pm 71,98	799,99 \pm 187,38	516,65 \pm 28,47
4	123,99 \pm 13,32	84,99 \pm 5	141,67 \pm 6,76	103,67 \pm 14,10	739,87 \pm 48,13	679,26 \pm 61,94	732,20 \pm 155,06	726,93 \pm 61,51
6	107,01 \pm 16,25	74,00 \pm 5,14	111,68 \pm 4,64	128,64 \pm 19,40	713,04 \pm 126,19	536,00 \pm 23,78	780,25 \pm 152,15	720,10 \pm 77,91
8	69,34 \pm 12,04	23,67 \pm 2,40	87,34 \pm 3,53	89,32 \pm 22,40	151,31 \pm 40,22	129,49 \pm 10,48	139,35 \pm 36,19	115,00 \pm 18,59
10	63,11 \pm 18,30	15,78 \pm 4	73,08 \pm 8,67	68,43 \pm 15,11	14,44 \pm 3,47	56,22 \pm 18,19	66,43 \pm 2,13	83,09 \pm 30,22
12	58,01 \pm 10,77	14,45 \pm 2,26	61,13 \pm 4,22	79,11 \pm 20,82	11,56 \pm 2,79	50,01 \pm 14,05	72,70 \pm 4,01	62,41 \pm 12,52

Tabla 2. Diámetro y longitud (mm) de carpósporas y tetrasporofitos juveniles de *Sarcothalia crispata* sobre distintos sustratos. Los valores representan la media \pm error estándar para n = 3.

Semana	Vidrio		Sogas		Conchillas		Piedras	
	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud
0	0,03		0,03		0,03		0,03	
2	0,04		0,05		0,05		0,03	
4	0,19 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,17	0,12 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,15	0,13	0,10 \pm 0,02
6	0,33	0,29 \pm 0,02	0,22 \pm 0,02	0,24 \pm 0,04	0,28 \pm 0,01	0,28 \pm 0,03	0,25	0,20 \pm 0,01
8	0,43 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	0,31 \pm 0,05	0,33 \pm 0,02	0,43 \pm 0,03	0,30 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02
10	0,51 \pm 0,02	0,82 \pm 0,08	0,31 \pm 0,03	0,48 \pm 0,08	0,37 \pm 0,02	0,60 \pm 0,03	0,36 \pm 0,01	0,42 \pm 0,05
12	0,56 \pm 0,04	1,01 \pm 0,1	0,37 \pm 0,05	0,54 \pm 0,06	0,45 \pm 0,01	0,76 \pm 0,06	0,47 \pm 0,05	0,52 \pm 0,07

Tabla 3. Diámetro y longitud (mm) de tetrásporas y gametofitos juveniles de *Sarcothalia crispata* sobre distintos sustratos. Los valores representan la media \pm error estándar para n = 3.

Semana	Vidrio		Sogas		Conchillas		Piedras	
	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud
0	0,02		0,02		0,02		0,02	
2	0,02		0,02		0,02		0,02	
4	0,06		0,06 \pm 0,01		0,06 \pm 0,01		0,05	
6	0,14 \pm 0,01	0,14	0,13 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,13	0,11	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
8	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,20	0,19 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	0,23 \pm 0,03
10	0,33 \pm 0,05	0,47 \pm 0,09	0,24 \pm 0,002	0,27 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02	0,41 \pm 0,04	0,28 \pm 0,01	0,38 \pm 0,02
12	0,48 \pm 0,1	0,85 \pm 0,25	0,26 \pm 0,02	0,34 \pm 0,05	0,36 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	0,49 \pm 0,02